Aus dem Städtischen Krankenhaus Neukölln
II. Innere Abteilung
Chefärztin: Prof. Dr.med. Irene Boll

DIE DIFFERENTIALVERTEILUNG DES MENSCHLICHEN FETALEN KNOCHENMARKES UND DESSEN PROLIFERATIONSVERHALTEN IN VITRO

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Peter Melsheimer
aus Lövenich/Erkelenz

1985

Aus dem Städtischen Krankenhaus Neukölln
II. Innere Abteilung
Chefärztin: Prof. Dr.med. Irene Boll

DIE DIFFERENTIALVERTEILUNG DES MENSCHLICHEN FETALEN KNOCHENMARKES UND DESSEN PROLIFERATIONSVERHALTEN IN VITRO

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Peter Melsheimer
aus Lövenich/Erkelenz

Referent: Professor Dr. med. Irene Boll

Korreferent: Professor Dr. med. H.-J. Merker

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche der Freien Universität Berlin

Promoviert am : 4. Oktober 1985

Meinen Eltern gewidmet.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Fragestellung	6
3.	Material und Methode	7
3.1.	Material	7
3.2.	Methode	12
3.3.	Auswertung	14
3.4.	Statistik	18
3.5.	Verwendete Abkürzungen	19
4.	Ergebnisse	20
4.1.	Knochenmarkausstriche von Feten verschiedenen Alters	20
4.2.	Serumzusatzkulturen	28
4.3.	Zusammenfassung der Kulturergebnisse	63
5.	Diskussion	71
6.	Zusammenfassung	77
7.	Literaturverzeichnis	78
8.	Fotografischer Anhang	87

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549615_0045

1. EINLEITUNG

Die humane embryonale Blutbildung beginnt etwa ab der 3. Schwangerschaftswoche (SSW) im Dottersack. Während lange Zeit die Ansicht vorherrschte, daß die primitive Hämatopoese intravaskulär aus mesenchymalem Gewebe entstehe (39), wird in neueren Arbeiten (23,34) die Meinung vertreten, daß der Ursprung der Blutzellbildung in der endodermalen Schicht des Dottersacks, also extravaskulär, zu finden sei, ihre weitere Reifung jedoch von der Freisetzung in mesodermales Gewebe und in die Blutgefäße abhänge. Möglicherweise spielt auch die äußere mesotheliale Schicht des Dottersacks in diesem Prozeß eine noch ungklärte Rolle. Die Dottersack-Hämatopoese besteht vorwiegend aus primitiven Erythroblasten und phagozytierenden Zellen. Ganz vereinzelt wurden primitive Megakaryozyten und granulierte Zellen gefunden. Von den oben zitierten Autoren FUKUDA (23) und HOYES (34) wird angenommen, daß die phagozytierenden Zellen die Aufgabe besitzen, durch Phagozytose die ausgereiften Blutzellen zu beseitigen. Ihre Herkunft leiten sie nicht von Monozyten ab, wie dieses von den Gewebsmakrophagen des Erwachsenen getan wird (27,42). Es besteht nämlich Einigkeit darüber, daß es zur Zeit der Dottersack-Hämatopoese keine monozytären und lymphozytären Zellen gibt. Über die eigentliche Abstammung der phagozytierenden Zellen besteht jedoch Unklarheit.

Die hepatische Phase der Hämatopoese beginnt etwa ab der 6. Woche (25), erkennbar an dem extravaskulären intraparenchymalen Auftreten von Blutzellen. Die Blutzellbildung besteht zum überwiegenden Teil aus erythrozytären Zellen. In geringen Mengen wurden granulozytäre, lymphozytäre, monozytäre und thrombozytäre Zellen gefunden (24,55). Die hämatopoetische Funktion der Leber erreicht ihren Höhepunkt zwischen dem 3. und 4. fetalen Monat. Anschließend kommt es zu einem allmählichen Erlöschen dieser Funktion, so daß zur Zeit der Geburt kaum noch Hämatopoese in der Leber gefunden wird (30).

Die Milz beginnt mit der Bildung von Blutzellen etwa ab dem 3. Monat. Die Zusammensetzung besteht zum größten Teil aus erythrozytären und lymphozytären Zellen. In geringer Anzahl wurden auch granulozytäre, thrombozytäre und monozytäre Zellen in der Milz beschrieben (35,41).

Die myeloische Hämatopoese beginnt beim menschlichen Embryo im femoralen Mark in der 10. Woche und ist dort bis zur 13. Woche voll ausgeprägt (59). Zu diesem Zeitpunkt sind weitgehend alle Zellreihen vorhanden. Den größten Anteil bilden etwa zu gleichen Teilen erythrozytäre, granulozytäre und lymphozytäre Zellen (35,58,59). Schon HAMMAR (32) zeigte 1901, daß das Knochenmark (KM) drei Entwicklungsstadien durchläuft. Das von ihm so benannte "primäre Mark" besteht aus einem gallertigen durchsichtigen Bindegewebe, welches reich vaskularisiert ist, selbst jedoch keine Blutzellen besitzt. Ihm folgt das "rote Mark",welches in hohem Maße der Blutbildung fähig ist. In vielen Knochen degeneriert später das rote Mark zu Fettmark, dem sogenannten "gelben Mark". EMERY und FOLLET (19) wiesen anhand eines umfangreichen Sektionsgutes nach, daß diese letzte Umwandlung des Knochenmarks vom Ereignis der Geburt unabhängig ist.

Die Rolle des Thymus in der humanen fetalen Hämatopoese ist noch weitgehend ungeklärt. TAYLOR und SKINNER (53) wiesen in menschlichen Feten ab der 16. Gestationswoche mit immunohistochemischen Methoden in diesem Organ die Existenz von lymphozytären, erythrozytären und granulozytären Zellen nach.

Ein in der Literatur äußerst umfangreich und kontrovers diskutiertes Thema ist das "Stammzellproblem" im Feten. Dieses umfaßt sowohl die morphologische Suche nach der pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle, als auch den Weg der Stammzellbesiedlung im Feten.

Morphologisch als pluripotente Stammzellen charakterisiert wurden im Feten auf Grund von morphologischen, sowie

funktionellen Untersuchungen an Mensch und Tier die grossen Retikulumzellen (39), die parenchymalen Leberzellen (14), die kleinen Knochenmarklymphozyten (56), die mittleren und großen Blutlymphozyten (17) und die Transitionalzellen (61,62).

Für die "Stammzellbesiedlung einzelner fetaler Organe" gibt es im wesentlichen zwei Theorien. Die erste besagt, daß die einzelnen hämatopoetischen Organe unabhängig voneinander entstehen und daß diese Organe verschiedene Stammzellen besitzen. Diese Theorie wird vorwiegend durch morphologische Untersuchungen gestützt. Ihr jüngster Vertreter ist FUKUDA (23,24). Die zweite Theorie besagt, daß es nur eine pluripotente hämatopoetische Stammzellspezies im Feten gibt, die ihren Ursprung im Dottersack besitzt und von dort aus in die peripheren Blutbildungsorgane über das Blut geschwemmt wird. Die Ansicht wurde entwickelt auf Grund statistischer Berechnungen im Tierversuch aus dem Gehalt von CFU_s (2) und der CFU_c beim Menschen (36) im fetalen Blut. MOORE und METCALF (44) kultivierten Mäuseembryonen mit und ohne Dottersack. Das Fehlen von CFU_s im Blut von kultivierten Mäuseembryonen ohne Dottersack ließ sie die obige Theorie favorisieren. Den unterschiedlichen Zeitpunkt der Stammzellbesiedlung einzelner Organe führten MOORE und OWEN (43) auf den Einfluß von deren Microenvironment zurück. Sie versuchten, dieses durch Zellmarkierungsversuche an Hühnerembryonen nachzuweisen. Auch HAAS, HOELZER et al. (29) stützten obige Theorie durch Versuche mit der Diffusionskammermethode an Ratten.

Über die Entstehung des Immunsystems existieren ebenfalls zwei kontroverse Theorien. Die erste äußert sich in der Aussage, daß die Entwicklung des Immunsystems nicht vor dem zweiten Lebensmonat beginnt. Sie basiert im wesentlichen auf der Untersuchung von BRIDGES et al. aus dem Jahr 1959 (13).Von einem Neugeborenen einer Mutter mit in der Schwangerschaft vorhandener Agammaglobulinämie wurden Serumproben auf Gamma-Globuline untersucht. Das Ergebnis verlautbarte ein jegliches Fehlen von Gamma-Globulinen im Serum des Neugeborenen innerhalb der ersten sechzig Lebenstage. Ferner enthielten Knochen-

mark und Darmlymphknoten bis zu diesem Zeitpunkt keine Plasmazellen. Gamma-Globuline und Plasmazellen konnten bei diesem Kind erst nach 60 Tagen nachgewiesen werden. Ferner untersuchten obige Autoren den Plasmazellenanteil im KM und den Darmlymphknoten Neugeborener gesunder Mütter und fanden auch hier ein jegliches Fehlen obiger Zellart bis zur vierten Lebenswoche. Die Theorie der Entstehung des Immunsystems nach der Geburt wurde zusätzlich gestützt durch die Beobachtung der Pädiater, daß bei Neugeborenen die Anzahl der Blutlymphozyten innerhalb der ersten 14 Lebenstage ansteigt (1). Im Gegensatz dazu gelang van FURTH et al. (26) 1965 der Nachweis von Immunglobulinen in Milzkulturen humaner Feten zwischen der 13. und 31. Gestationswoche. Die Zellen, die in diesen Kulturen die Immunglobuline produzierten, konnten immunohistochemisch als Plasmazellen identifiziert werden. Diese Untersuchung gab den Anlaß zu der Vermutung, daß der Fetus schon in seiner frühesten Lebenszeit immunkompetent ist. Unterstützt wurde diese Ansicht von SILVERSTEIN und LUKES (50), die in Lymphknoten von humanen Feten nach intrauteriner Infektion mit Toxoplasmose die Entstehung von Keimzentren und Plasmazellen nachweisen konnten.Ähnliches konnte für humane Feten nach intrauteriner Infektion mit Syphilis (51) und Röteln (52) gezeigt werden. Schließlich gelang TAYLOR und SKINNER (53) 1976 mit immunohistochemischen Methoden der Nachweis von Plasmazellen im Thymus gesunder menschlicher Feten ab der 20. Gestationswoche.

Erste Hinweise für eine von der Mutter unabhängige Produktion von Erythropoetin (Ep) des Feten brachten Versuche mit Anti - Erythropoetin an schwangeren Mäusen (49). Untersuchungen an schwangeren Ziegen (64) und Schafen (63) schienen obige Theorie zu bestätigen. Hier wurde in den fetalen Kreisläufen dieser Tiere durch Injektion von Phenylhydrazin eine Anämie erzeugt. Im fetalen Serum stiegen die Ep - Werte reaktiv an, während im mütterlichen Kreislauf die Ep - Werte unbeeinflußt niedrig blieben. Ähnliche Ergebnisse wurden von MEBERG (40) an schwangeren Ratten erbracht, die einer kurz-

zeitigen Hypoxie ausgestzt wurden. Beim Menschen wurden in der Amnionflüssigkeit (20) und im Nabelschnurvenenblut Frühgeborener (21) nach klinisch gesicherter intrauteriner Hypoxie oder Ischämie erhöhte Ep - Werte von FINNE nachgewiesen. Die autonome Ep - Produktion des menschlichen Feten hielten daraufhin FINNE und HALVORSEN (22) für gesichert.

Erste Hinweise auf einen extrarenalen Produktionsort von fetalem Ep kamen von LUCARELLI et al. (38), die in den ersten 20 Tagen nach der Geburt bei neugeborenen Ratten nach beidseitiger Nephrektomie keine Verminderung der Erythropoese feststellen konnten. Der Nachweis von Ep in fetalen Leberzellkulturen von Mäusen gelang ZUCALI et al. (66). In den gleichen Kulturen wurden daraufhin die Kupfferschen Sternzellen als Ep - produzierende Zellen mit immunohistochemischen Methoden von GRUBER et al. identifiziert. Auch beim menschlichen Feten wird eine extrarenale Ep - Produktion auf Grund von Beobachtungen normaler Blutwerte bei Neugeborenen mit beidseitiger Nierenagenesie von HALVORSEN et al. (31) für wahrscheinlich gehalten.

2. FRAGESTELLUNG

In der vorliegenden Arbeit sollen primär zwei Fragen beantwortet werden:

1) Welche Zusammensetzung besitzt das Knochenmark von menschlichen Feten zwischen der 16. und 24. SSW, welche Zellarten können überhaupt im fetalen KM dieses Alters beobachtet werden und welche Änderung der Zellzusammensetzung kommt in obigem Zeitraum vor?

2) Wie verhält sich humanes fetales Knochenmark zwischen der 18. und 24. SSW in der Suspensionskultur unter Zugabe stimulierender Seren? Bekannt sind ein besonders hoher Spiegel humanen Erythropoetins im Serum von Patienten mit chronischer Erythroblastopenie (PRCA) (46) und eine hohe Colony Stimulating Activity (CSA) im Serum von Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie (CML) (10,41).So wurden in getrennten Versuchsreihen die fetalen Knochenmarkzellen auf ihre Ansprechbarkeit gegenüber Erythropoetin und CSA untersucht.

3. MATERIAL UND METHODE

3.1 Material

Das für unsere Versuche benötigte Knochenmark erhielten wir mittels Punktion des Humerusknochenmarks von humanen Feten verschiedenen Alters. Das Gestationsalter der Feten wurde aus anamnestischen Daten der Mutter, dem ersten Tag der letzten Regelblutung vor der Schwangerschaft, errechnet. Im folgenden werden nähere Angaben über diese Feten gemacht:

Fetus 1: 16.SSW, durch intraamniale Applikation von Prostaglandin induzierter Abort aus eugenischer Indikation, Verarbeitung des KM 45 Min. nach dem Abort.

Fetus 2: 17.SSW, durch intraamniale Applikation von Prostaglandin induzierter Abort wegen anamnestisch bekannter Rötelinfektion und nachgewiesenem steigendem Rötelntiter im Blut der Mutter, Verarbeitung des KM 4Std. nach Abort

Fetus 3: 18.SSW, Beendung der Schwangerschaft durch abdominelle Hysterektomie nach Primidoneinnahme der Mutter wegen Epilepsie, Verarbeitung des KM 4 Std. nach der Op.

Fetus 4. 19.SSW, Spontanabort nach vorzeitigen Wehen und vorzeitiger Randablösung der Placenta, Verarbeitung des KM 3Std.50Min. nach dem Abort.

Fetus 5: 20.SSW, durch intraamniale Applikation von Prostaglandin induzierter Abort wegen anamnestisch bekannter Rötelninfektion und nachgewiesenem steigendem Rötelntiter im Blut der Mutter, Verarbeitung 2Std. nach Abort

Fetus 6: 21.SSW, Spontanabort aus ungeklärter Ursache, Verarbeitung des KM 3 Std. nach Abort

Fetus 7: 23.SSW, Spontanabort aus ungeklärter Ursache, Verarbeitung des KM 1 Std. nach Abort.

Fetus 8: 24.SSW, Beendung der Schwangerschaft durch abdominelle Hysterektomie wegen Cervix-Ca. der Mutter, Verarbeitung des KM 4 Std. nach der Operation, bis zur Knochenmarkentnahme wurde dieser Fetus in einer speziell präparierten Kühltasche gelagert.

Das bei -20° C aufbewahrte Serum von folgenden Patienten wurde aufgetaut als Kulturzusatz verwendet:

PRCA-Serum: Entnahme am 6.12.79

Patientin: S.,Gerda, 66 Jahre
Diagnose: Chronische isolierte Erythroblastopenie
Sternalpunktion vom 31.1.79: relativ vermehrte, nicht verschobene Granulopoese, normale Thrombopoese, normale Monozytopoese, normoblastische, aber nahezu aplastische Erythropoese, nur ganz vereinzelt Proerythroblasten

Blutbild vom 30.11.79:

Erythrozyten	2,7	Mill./mm^3
Hb	8,4	g%
Hb_E	31	pg
Reticulozyten	keine	
Leukozyten	9700	/mm^3
Segmentkernige	77	%
Stabkernige	6	%
Eosinophile	1	%
Basophile	1	%
Lymphozyten	14	%
Monozyten	1	%
Thrombozyten	82000	/mm^3
BSG	10 / 31	mm n.W.

Medikation:

Novodigal^R 0,2 mg	2X1 Tabl./d
Prednisolon^R	30 mg/d

CML-Serum 1: Entnahme am 14.4.77

Patientin: K.,Berta,78 Jahre

Diagnose: Chronisch myeloische Leukämie, sek. Hyperurikämie, vorw. myokardiale Rechtsherzinsuffizienz, chron. Niereninsuffizienz im Stad. d. komp. Retention, Hypertonie

Sternalpunktion vom 12.4.77: Befund wie bei chronisch myeloischer Leukämie, gesteigerte und linksverschobene Granulopoese, normale Thrombopoese, normale Monozytopoese, normoblastische, aber stark verminderte und rechtsverschobene Erythropoese

Blutbild vom 14.4.77:

Erythrozyten	5,21 Mill./mm^3
Hk	49,3 %
Hb	14,7 g%
Hb_E	28,1 pg
Thrombozyten	750000 /mm^3
Leukozyten	203000 /mm^3
Myeloblasten	0 %
Promyelozyten	15 %
Myelozyten	11 %
Metamyelozyten	16 %
Stabkernige	22 %
Segmentkernige	31 %
Lymphozyten	2 %
Monozyten	3 %
BSG	15/40 mm n.W.
ALP	0
Ph_1 Chromosom	positiv

Therapie:

Lanicor^R	2X1 Tabl./d
Aldactone^R 100	3X1 Tabl./d
Zyloric^R	3X1 Tabl./d

CML-Serum 2: Entnahme am 2.12.80

Patientin: M.,Waltraud, 32 Jahre

Diagnose: Chronisch myeloische Leukämie

Sternalpunktion vom 1.12.80: Befund wie bei chronisch myeloischer Leukämie, vermehrte und linksverschobene Granulopoese, Eosinophile, Promonozyten und Monozyten vermehrt, Mikrokaryozyten, Thrombopoese sonst normal, Lymphopoese vermindert, stark verminderte Erythropoese

Blutbild vom 2.12.80:

Erythrozyten	3,3	Mill./mm^3
Hk	32,7	%
Hb	9,7	g%
Hb_E	29,8	pg
Thrombozyten	556000	/mm^3
Leukozyten	128000	/mm^3
Myeloblasten	3	%
Promyelozyten	2	%
Myelozyten	4	%
Metamyelozyten	4	%
Stabkernige	10	%
Segmentkernige	52	%
Lymphozyten	9	%
Monozyten	1	%
Eosinophile	9	%
Basophile	6	%
BSG	27/52	mm n.W.
ALP	0	
Ph_1 Chromosom	positiv	

Therapie: Myleran^R 6X2 mg wöchentlich

CML-Serum 3: Entnahme am 12.2.80

Patient: K.,Bodo, 34 Jahre

Diagnose: Chronisch myeloische Leukämie

Sternalpunktion vom 31.1.80: Befund wie bei chronisch myeloischer Leukämie, gesteigerte und linksverschobene Granulopoese, deutliche Eosinophilie, Thrombopoese reichlich in allen Reifungsstadien, Monozytopoese normal, Mikrokaryozyten, verminderte, jedoch nicht verschobene Erythropoese. Durch eine anschließende Beckenkammbiopsie konnte eine Osteomyelosklerose ausgeschlossen werden.

Blutbild vom 12.2.80:

Erythrozyten	4,1	Mill.
Hk	37,7	%
Hb	12,0	g%
Hb_E	29,3	pg
Thrombozyten	233000	/mm^3
Leukozyten	90000	/mm^3
Promyelozyten	4	%
Myelozyten	7	%
Metamyelozyten	9	%
Stabkernige	23	%
Segmentkernige	50	%
Lymphozyten	5	%
Monozyten	1	%
Basophile	1	%
BSG	46/65	mm n.W.
ALP	1	
Ph_1 Chromosom	nicht nachweisbar	

Therapie: keine

3.2 Methode

Lichtmikroskopisch untersucht wurde das Femurmark von humanen Feten verschiedenen Alters (S.3.1). Die Zellausstriche des Knochemarks wurden nach Pappenheim gefärbt. Ferner wurden Kulturansätze nach einer 1975 von I. Boll entwickelten Technik und leicht modifizierten Methode hergestellt (8).
Dazu wurden die in heparinhaltiger (5 - 10 E/ml) Hanks - Lösung (Difco Laboratories, Detroit Michigan 48232, USA) aspirierten Markbröckelchen in RPMI - Medium 1640 "mit Glutamin" (Gibco - Bio - Cult, 3 Washington Road, Paisley PA3 4EP, Scotland) gebracht und mit Hilfe mehrmaliger Passagen durch Kanülen abnehmenden Kalibers homogenisiert.
Danach erfolgten die Kulturansätze:

Kontrollansatz (alle Versuche):

0,2 ml Corhormon^{R} (10%)
1,8 ml Zellsuspension in RPMI - Medium
11,3 µg Ampicillin
2,4 µg Streptomycin

PRCA-Serumzusatzkultur (Versuche 1,3,4,5,6):

0,8 ml PRCA - Serum (≙ 40% vom Gesamtansatz)
1,2 ml Zellsuspension in RPMI - Medium
(zusätzlich 4µg Fe II-Sulfat und
0,05 µg Cytobion^{R} pro ml Suspension)
11,3 µg Ampicillin
2,4 µg Streptomycin

CML- Serumzusatzkultur Versuch 2:

1,7 ml CML - Serum 1 (≙ 85 % vom Gesamtansatz)
0,3 ml Zellsuspension in RPMI - Medium
11,3 µg Ampicillin
2,4 µg Streptomycin

CML - Serumzusatzkultur Versuch 4:

2,0 ml CML-Serum 2 (≙100% vom Gesamtansatz)
+ Zellsediment
11,3 µg Ampicillin
2,4 µg Streptomycin

CML - Serumzusatzkultur Versuch 6:

1,4 ml CML-Serum 3 (≙70% vom Gesamtansatz)
0,6 ml Zellsuspension in RPMI - Medium
11,3 µg Ampicillin
2,4 µg Streptomycin

Die Kulturansätze wurden getrennt in sterile Einmalgefäße so aufgeteilt, daß für jede Stichprobe zwei Gefäße vorhanden waren. Die Gefäße wurden luftdicht verschlossen, über der Flüßigkeit befand sich eine relativ große Gasphase.
Nach der Inkubation bei 37° C wurden nach 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden jeweils drei Ausstriche mit Hilfe der Zytozentrifuge (500 U/min ≙ 22·g) angefertigt und nach Pappenheim gefärbt. Die 0 Stunden Kontrollpräparate , die Ausgangswerte der Kultur, wurden vor der Inkubation mit der Zytozentrifuge angefertigt.

3.3 Auswertung

Von jedem Knochenmarkausstrich und jedem Kulturtag wurden, soweit es die Qualität des Präparates zuließ, etwa 2000 Zellen lichtmikroskopisch differenziert. Insgesamt wurden etwa 90000 Zellen ausgezählt.

Wie aus den Übersichten von BOLL (9) und HAAS (30) zu ersehen ist, besteht das Problem der Knochenmarkdifferenzierung von humanen Feten in der nicht einheitlich geregelten Definition der fetalen Knochenmarkzellen. Im folgenden werden alle differenzierten Zellen aufgeführt. Die Zellen, die von den Zellen adulten Knochenmarks abweichen, werden nach KELEMEN, CALVO und FLIEDNER (35) und ZUCKER-FRANKLIN et al. (67) definiert. Für alle anderen Zellen gelten die von BOLL (11), HECKNER (33), UNDRITZ (57), BEGEMANN et al. (4) und ZUCKER-FRANKLIN et al. (67) aufgestellten Kriterien für adulte Knochenmarkzellen. Die Definitionen für alle unten nicht näher beschriebenen Zellen können bei BOLL (11) nachgelesen werden.
Differenziert wurden:

1. Osteoblasten
2. Osteoklasten
3. kleine Lymphozyten - Ihr Zelldurchmesser ist kleiner als 9 µm. Der Kern ist von verwaschener, wolkig unscharfer Struktur. Der Kern besitzt keine Nukleolen. Die Zelle besitzt einen sehr schmalen Zytoplasmasaum, der eine hellblaue Farbe und vereinzelt feine azurophile Granula hat.
4. große Lymphozyten - Ihr Zelldurchmesser ist größer als 9 µm. Im weiteren entsprechen sie in ihrem Aussehen den kleinen Lymphozyten.
5. "lymphozytenähnliche" Zellen - Ihr mittlerer Zelldurchmesser beträgt etwa 9 µm. Der Kern ist überwiegend rund und in characteristischer Weise eingekerbt. Die Kernstruktur ist im Gegensatz zu Lymphozyten feinnetzig. Der Kern hat meist 1 bis 2 Nukleolen. Das Zytoplasma ähnelt dem von Lymphozyten.
6. Plasmoblasten - Sie sind identisch mit denen aus adultem KM. Sie unterscheiden sich von den Plasmazellen durch das zugunsten des Kerns verschobene Kern-Plasma-

Verhältnis, durch eine aufgelockerte Kernstruktur und nur schwach basophiles Zytoplasma.

7. Plasmazellen nach Marschalko - Sie sind charakterisiert durch einen kleinen, dichten, exzentrisch gelegenen Kern und dunkelbasophiles Zytoplasma in großer Ausdehnung (Kern-Plasma-Verhältnis 1:4,3). Eine ca. 1µm große Vakuole ist obligat, die perinukleäre Aufhellung zentral vom Kern meistens gut zu erkennen.
8. kleine Retikulumzellen - Ihr Zelldurchmesser ist kleiner als 9µm. Der Kern ist rund oder oval, die Kernstruktur aufgelockert retikulär. Sie besitzen meist 1 bis 2 scharf abgrenzbare Nukleolen. Das Zytoplasma ist, wenn vorhanden, sehr schmal und hell basophil. Sie können im allgemeinen gut von kl. Lymphozyten unterschieden werden.
9. große Retikulumzellen - Ihr Zelldurchmesser ist größer als 9 µm. Im weiteren ähneln sie in ihrem Aussehen den kleinen Retikulumzellen. Ihre Kernstruktur ist lockerer als die der gr. Lymphozyten. Die Kerne sind oft oval.
10. Hämozytoblasten

11. Megakaryoblasten
12. Megakaryozyten

13. Proerythroblasten
14. basophile Erythroblasten
15. polychromatische Erythroblasten
16. orthochromatische Erythroblasten
17. reife Erythroblasten

18. Myeloblasten
19. embryonale Granuloblasten - Diese Zellart existiert ausschließlich in humanem fetalen Knochenmark und wurde von Kelemen, Calvo und Fliedner (35) beschrieben und dokumentiert.
    Ihr Zelldurchmesser beträgt zwischen 14 und 24 µm. Die Kernform ist sehr variabel: Oval, rund, eingekerbt, "kleeblattförmig" oder "hufeisenförmig". Die Kernstruktur ist verwaschen, das Chromatin ist feinfädig-engmaschig transparent. Mehrere Nukleolen

können vorhanden sein. Der Kern ist stets scharf vom Zytoplasma abgrenzbar. Das Zytoplasma hat eine charakteristische schwach basophile bis blaugraue Farbe. Die Zelle besitzt einen breiten Zytoplasmasaum. In ihm befindet sich eine leichte azurophile Granulation. Das Zytoplasma ist stets scharf abgrenzbar (Foto 1).

20. Promyelozyten
21. Myelozyten
22. eosinophile Myelozyten
23. Promonozyten
24. Metamyelozyten
25. neutrophile Stabkernige
26. neutrophile Segmentkernige
27. eosinophile Segmentkernige
28. basophile Segmentkernige
29. Monozyten
30. phagozytierende Retikulumzellen

Bei der Erythropoese gelten die Zellen 13 - 17, bei der Granulopoese die Zellen 18 - 24 als teilungsfähig.

Aus den gewonnenen Daten können folgende Parameter abgeleitet werden:

1) Reifungskurven: Sie zeigen die prozentuale Verteilung der differenzierten Zellen in Erythropoese (Zellen 13 - 17) und Granulopoese (Zellen 18 - 29) am jeweiligen Kulturtag. Die Werte werden in der graphischen Darstellung additiv aufgetragen.

2) G/E - Index: Er gibt das Verhältnis von Granulopoese zu Erythropoese an.

3) Mitose - Index: Er ist definiert als Anteil in Teilung befindlicher Zellen auf 1000 teilungsfähige. Er wird für Erythropoese und Granulopoese getrennt ermittelt und in %o angegeben.

4) Karyologische Kurven: Sie geben die prozentuale Mitosephasenverteilung bezogen auf die Gesamtzahl der Mitosen wieder. Die im folgenden verwendeten Abkürzungen lauten:

P - Prophase
fM - frühe Metaphase
sM - späte Metaphase
A - Anaphase
T - Telophase
R - Rekonstruktionsphase

5) Relativer Zuwachs der Zusatzkultur: Hiermit wird der relative Zuwachs einer Zellart der Zusatzkultur gegenüber der gleichen Zellart der Kontrollkultur angegeben. Er wird berechnet aus dem relativen Anteil der Zelle in der Kontrollkultur X_K und dem relativen Anteil der Zelle in der Zusatzkultur X_Z:

$$\frac{X_Z - X_k}{X_K} \cdot 100$$

Er wird in der Einheit % ausgedrückt.

3.4 Statistik

Beim Vergleich von Kontroll- und Zusatzkultur wurden die Unterschiede zwischen den Mitose - Indices sowie zwischen den Anteilen der einzelnen Zellarten mit dem x^2 - Verfahren nach H.PEARSON auf Signifikanz überprüft. Hierdurch soll das Maß der Übereinstimmung der miteinander verglichenen Werte untersucht werden. Folgende Formel wurde verwendet (5):

$$x^2 = \sum \frac{(B - E)^2}{E}$$

B = Beobachtungswert
E = Erwartungswert

Der so errechnete x^2 - Wert wird unter Berücksichtigung des Freiheitsgrades und unter Benutzung einer Kurventabelle (5) in einen Warscheinlichkeitswert (p) umgerechnet. Der Unterschied gilt dann als signifikant, wenn dieser Wert unterhalb einer willkürlich festgelegten Grenze liegt. In dieser Arbeit gilt:

$p > 0{,}05$	: Der Unterschied zwischen beiden Werten ist zufallsbedingt. (Keine Signifikanz)	Ø
$0{,}05 > p > 0{,}01$	: Zweifelhaft signifikant vermehrt	(+)
	vermindert	(-)
$0{,}01 > p > 0{,}001$	: Einigermaßen gesichert signifikant vermehrt	+
	vermindert	-
$p < 0{,}001$	: Statistisch signifikant gesichert vermehrt	++
	vermindert	--

3.5 Verwendete Abkürzungen:

Ob = Osteoblästen
Ok = Osteoklasten
kl Ly = kleine Lymphozyten
gr Ly = große Lymphozyten
Ly-ä = "lymphozytenähnliche" Zellen
Plb = Plasmoblasten
Plz = Plasmazellen
kl RZ = kleine Retikulumzellen
gr RZ = große Retikulumzellen
ph RZ = phagozytierende Retikulumzellen
HZB = Hämozytoblasten

Megbl = Megakaryoblasten
Megcy = Megakaryozyten

PE = Proerythroblasten
bE = basophile Erythroblasten
pE = polychromatische Erythroblasten
oE = orthochromatische Erythroblasten
rE = reife Erythroblasten

MB = Myeloblasten
eG = embryonale Granuloblasten
Pro = Promyelozyten
My = Myelozyten
eMy = eosinophile Myelozyten
Prmo = Promonozyten
MM = Metamyelozyten
Stb = neutrophile Stabkernige
Seg = neutrophile Segmentkernige
eSeg = eosinophile Segmentkernige
bSeg = basophile Segmentkernige
Mono = Monozyten

rMI = roter Mitoseindex
wMI = weißer Mitoseindex
G/E-I = G/E Index

4. ERGEBNISSE

4.1 Knochenmarkausstriche von Feten verschiedenen Alters

Die Ergebnisse sind in den Tabellen 1 bis 4 und in den Abbildungen 1 bis 6 dargestellt. Aus jeder SSW zwischen der 16. und 24. (mit Ausnahme der 22.SSW) konnte eine KM-Ausstrich ausgezählt werden.

Erythropoese:

Der Anteil der Erythropoese an der Gesamtzellzahl beträgt zwischen der 16. und 18. SSW etwa 40%, um daraufhin fortlaufend bis zur 21. SSW auf 7,8% abzufallen und bis zur 24. SSW auf 30 % wieder anzuwachsen (Abb.1). Dieser Verlauf zeinet sich ebenfalls bei den G/E - Indices ab (Tab.3 und Abb.5).

Die roten Mitose- Indices fallen zwischen der 16. und 21.SSW von 55‰ auf 12 ‰ tendenziell ab, um bei diesem Wert bis zur 23.SSW zu verharren. In der 24.SSW steigt der rMI erneut auf 26 ‰ (Tab.2, Abb.4).

Die Differentialverteilung der Erythropoese (Tab.2 u. Abb.2) zeigt während des gesamten Untersuchungszeitraums einen weitgehend konstanten Verlauf. Die polychromatischen Erythroblasten bilden stets die größte Zellgruppe.

Granulopoese:

Der Anteil der Granulopoese an der Gesamtzellzahl beträgt in der 16. und 17. SSW etwa 22%, um darauf fortlaufend bis zur 20. SSW auf 72 % anzusteigen, gefolgt von einem erneut fortlaufenden Abfall bis auf 36 % in der 24. SSW. Der Verlauf der G/E - Indices ist weitgehend entsprechend (Tab. 5, Abb. 3).

Die weißen Mitose - Indices steigen zwischen der 16. und 18. SSW von 11‰ auf 49‰ an. Bis zur 21. SSW fallen sie tendenziell auf 11‰ zurück, um dort, abgesehen von einem leichten Anstieg in der 24. SSW,zu verharren. (Tab.3, Abb.4).

Die Differentialverteilung der Granulopoese (Tab.3 u. Abb.3) zeigt eine tendenzielle Vermehrung der unreifen Zellen von der 16. SSW bis zur 21.SSW. Ab diesem Gestationsalter zeichnet sich ein Ausreifen der Granulopoese, erkenntlich an der Ver-

mehrung der reifen Zellen, ab.

Der Anteil der eG an der Gesamtzellzahl (Tab.1, Abb.1) steigt zwischen der 16. und 21. SSW fortlaufend von 12‰ auf 191‰, um ab der 23.SSW bei etwa 35‰ zu verharren.

Sonstige Zellen (Tab.1,Abb.1):

Plasmazellen n. Marschalko: Plasmazellen wurden in 6 von 8 untersuchten Feten gefunden. Die höchsten Werte erreichten Fetus 1 (16.SSW) mit 4‰ und Fetus 4 (19.SSW) mit 7‰ (Foto 2).

Osteoblasten u.Osteoklasten: Erwähnenswert ist der Abfall ihres Anteils mit der 20. SSW.

Kl.Lymphozyten: Der Anteil an der Gesamtzellzahl beträgt zwischen 10% und 38%. Eine Abhängigkeit der Zellzahl vom Gestationsalter oder von anamnestischen Daten ist nicht erkennbar. Dasselbe gilt für die gr. Lymphozyten und die Ly-ä.Zellen.

Kl. und gr. Retikulumzellen: Ihr Anteil sinkt zwischen 16. und 18. SSW., um dann relativ konstant zu bleiben.

Phagozytierende Retikulumzellen: Diese wurden in 5 von 8 Feten beobachtet. Ihr Anteil lag stets unter 1%.

Megakaryopoese: Vertreter dieser Zellreihe wurden in 6 von 8 Feten gesichtet. Sie waren schon in dem jüngsten untersuchten Feten vorhanden (16.SSW) . Ihr Anteil war stets unter 4 ‰.

Promonozyten und Monozyten: Diese Zellen wurden in allen Feten beobachtet. Ihr Anteil betrug stets unter 1%.

Mitosephasenverteilung (Abb.6):

Berechnet wurde die prozentuale Mitosephasenverteilung der gezählten Mitosen aller Feten und für Erythropoese, sowie für Granulopoese getrennt als karyologische Kurven dargestellt. Die Ergebnisse beider Zellreihen stimmen weitgehend mit den von BOLL und MERSCH (6 , 7) für die normale humane adulte Knochenmarkhämatopoese erarbeiteten Werten überein.

Tab.1: Differentialzählungen der Knochenmarkzellen von humanen Feten verschiedenen Alters. Angaben in Schwangerschaftswochen (SSW) und in Promille der Gesamtzellzahl.

	16SSW	17SSW	18SSW	19SSW	20SSW	21SSW	23SSW	24SSW
Ob	13	25	49	39	13	6	2	8
Ok	1	3	6	3	0	1	0	1
kl Ly	257	271	118	251	101	382	304	274
gr Ly	38	7	3	32	1	21	20	21
Ly-ä	10	16	5	28	12	15	7	18
Plb	0	0	0	2	0	0	0	0
Plz	4	1	0	7	1	1	0	1
kl RZ	56	24	11	1	8	2	2	13
gr RZ	4	24	16	2	16	3	3	3
ph RZ	3	3	0	9	0	2	0	1
HZB	1	3	1	0	2	1	1	0
Megbl	1	1	1	1	0	0	1	1
Megcy	2	1	1	2	0	0	1	1
PE	17	46	15	10	6	9	13	28
bE	71	38	37	26	6	13	16	70
pE	239	287	291	192	99	45	182	153
oE	48	1	23	5	6	3	3	30
rE	28	12	70	24	11	8	45	19
Σ+	403	384	436	257	128	78	259	300
MB	2	6	0	3	3	14	4	2
eG	12	37	43	68	71	191	34	37
Pro	17	19	57	86	83	118	21	35
My	27	41	36	34	55	43	21	37
eMy	3	0	1	6	1	1	0	5
Prmo	2	1	1	1	4	1	3	1
MM	26	22	51	62	77	61	75	42
Stb	69	34	71	57	282	21	105	67
Seg	38	75	86	26	139	32	125	114
eSeg	7	1	5	19	2	5	7	14
bSeg	1	0	0	1	0	0	0	3
Mono	3	1	2	3	1	1	6	1
Σ+ Prolif.	89	126	189	260	294	429	158	159
Σ+	207	237	353	366	718	488	401	358

Tab.2: Differentialverteilung der erythropoetischen Vorstufen (%) im Knochenmark humaner Feten verschiedenen Alters mit Angabe des prozentualen Anteils aller Erythroblasten an der Gesamtzellzahl aus Tab.1 und Angabe der Mitoseindices

	16SSW	17SSW	18SSW	19SSW	20SSW	21SSW	23SSW	24SSW
PE	4,3	11,8	3,5	3,9	5,0	11,0	4,9	9,3
bE	17,6	9,9	8,6	10,0	4,6	17,2	6,0	23,3
pE	59,1	74,6	66,7	74,9	77,3	57,1	70,5	51,0
oE	12,0	0,4	5,2	2,0	4,6	4,3	1,1	9,9
rE	7,0	3,3	16,0	9,2	8,5	10,4	17,5	6,5
Summe	100	100	100	100	100	100	100	100
%Gesamt	40,3	38,4	43,6	25,7	12,8	7,8	25,8	30,0
rMI (%)	54,6	11,5	33,9	18,4	23,1	12,3	12,7	26,5

Tab.3: Differentialverteilung der granulopoetischen Vorstufen (%) im KM hum. Feten versch. Alters mit Angabe des Anteils aller granulopoetischen Zellen (%) an der Gesamtzellzahl aus Tab.1 und Angabe der Mitoseindices und G/E Indices.

	16SSW	17SSW	18SSW	19SSW	20SSW	21SSW	23SSW	24SSW
MB	0,9	2,7	0	0,9	0,5	2,9	1,1	0,5
eG	5,7	15,8	12,2	18,6	9,9	39,1	8,4	10,5
Pro	8,2	8,1	16,2	23,6	11,5	24,1	5,3	9,8
My	13,6	17,4	10,1	9,3	7,6	8,8	5,2	10,2
eMy	1,3	0	0,3	1,6	0,1	0,3	0	1,4
Promo	0,9	0,4	0,4	0,3	0,5	0,2	0,7	0,1
MM	12,9	9,3	14,6	16,9	10,7	12,6	18,6	11,8
Stb	34,2	14,3	20,2	15,8	39,4	4,3	26,0	18,6
Seg	17,1	31,2	24,0	7,0	19,3	6,4	31,5	31,8
eSeg	3,4	0,4	1,3	5,0	0,3	1,0	1,8	4,1
bSeg	0,5	0	0	0,1	0	0	0	0,8
Mono	1,3	0,4	0,7	0,9	0,2	0,3	1,4	0,4
Summe	100	100	100	100	100	100	100	100
%Gesamt	20,7	23,7	35,3	36,6	71,8	48,8	40,1	35,8
wMI (%)	10,8	15,4	48,9	16,6	31,8	11,2	11,9	19,0
G/E-I	0,51	0,61	0,81	1,41	5,60	6,24	1,55	1,19

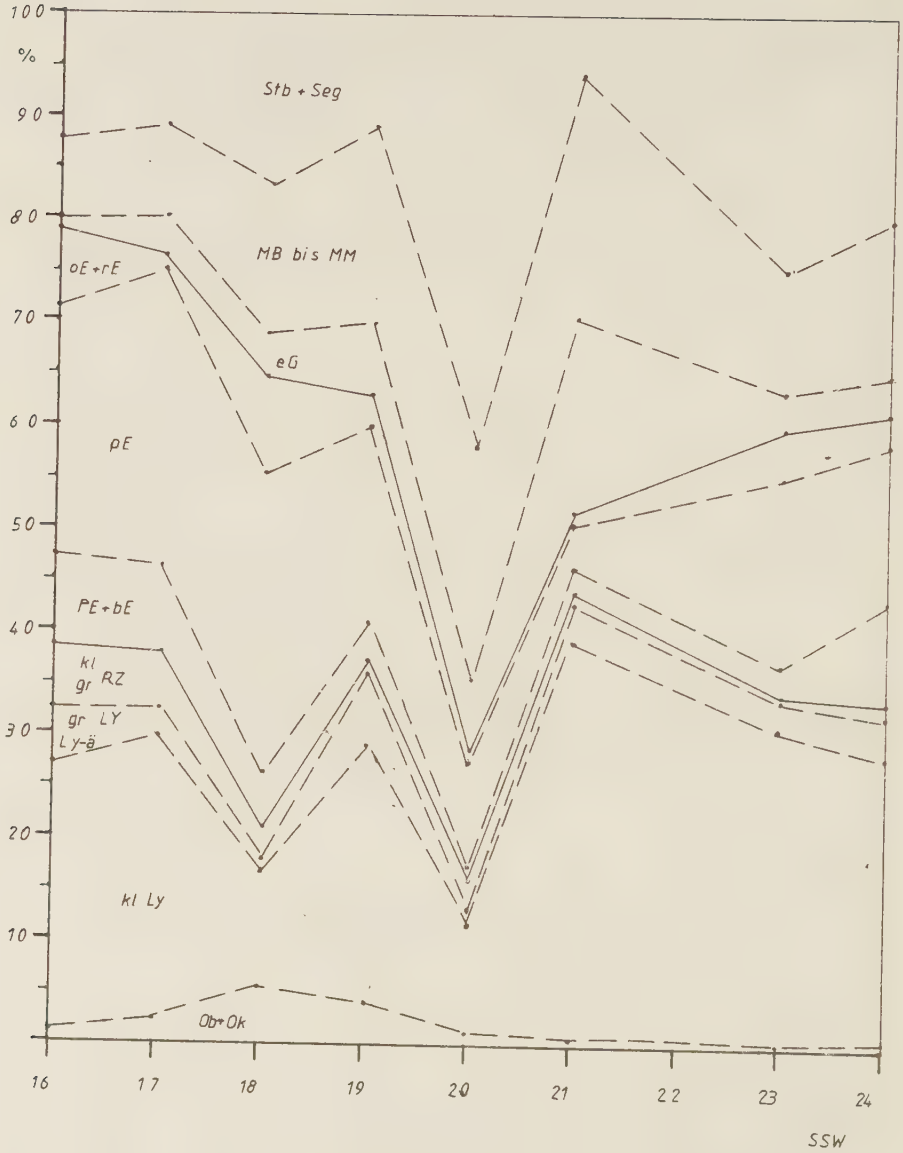


Abb.1: Differentialverteilung der Knochenmarkzellen humaner Feten verschiedenen Alters

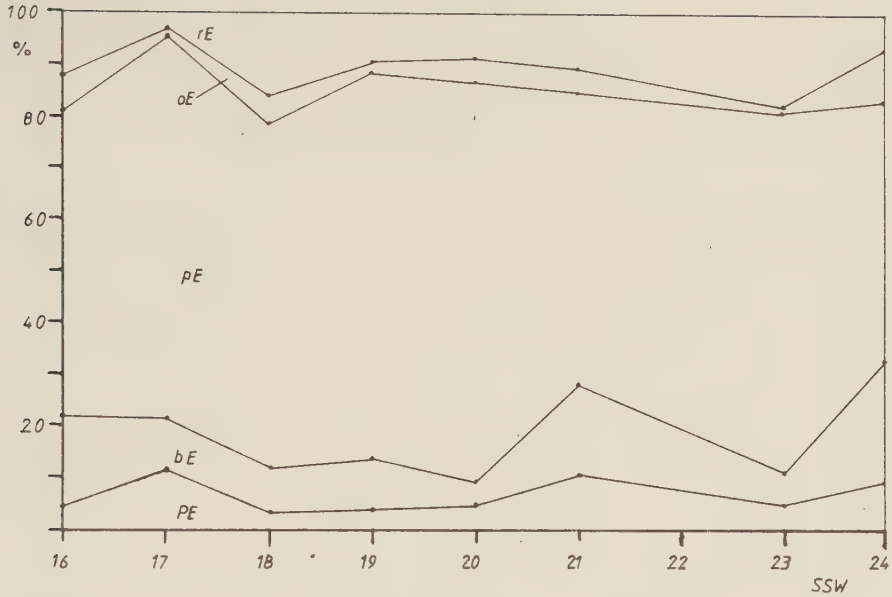


Abb.2: Differentialverteilung der Erythropoese

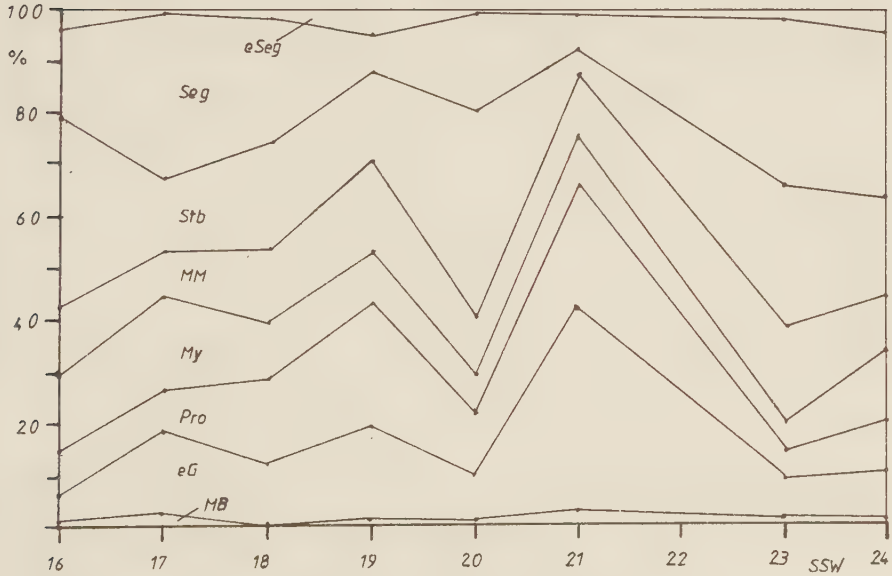


Abb.3: Differentialverteilung der Granulopoese

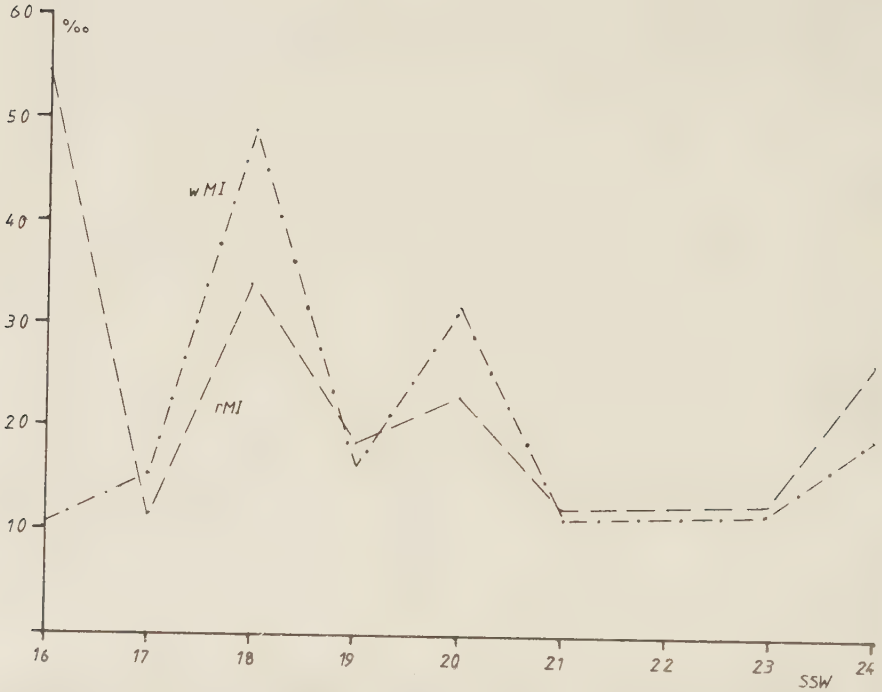


Abb.4: Mitoseindices des KM humaner Feten verschiedenen Alters

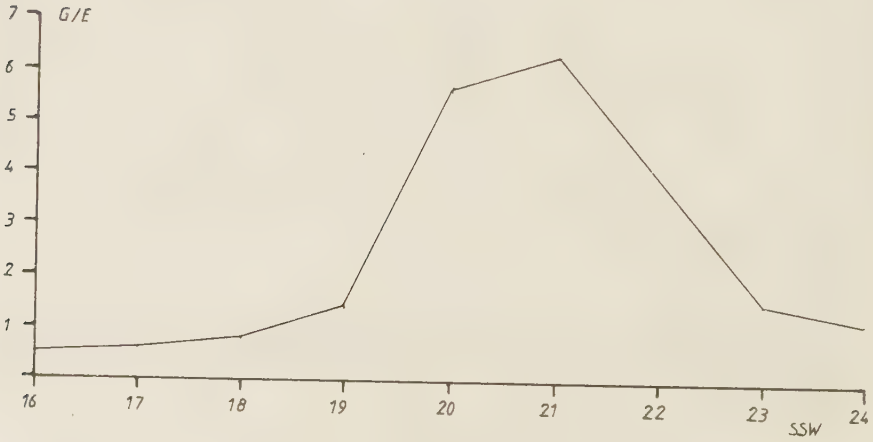


Abb.5: G/E Indices des KM humaner Feten verschiedenen Alters

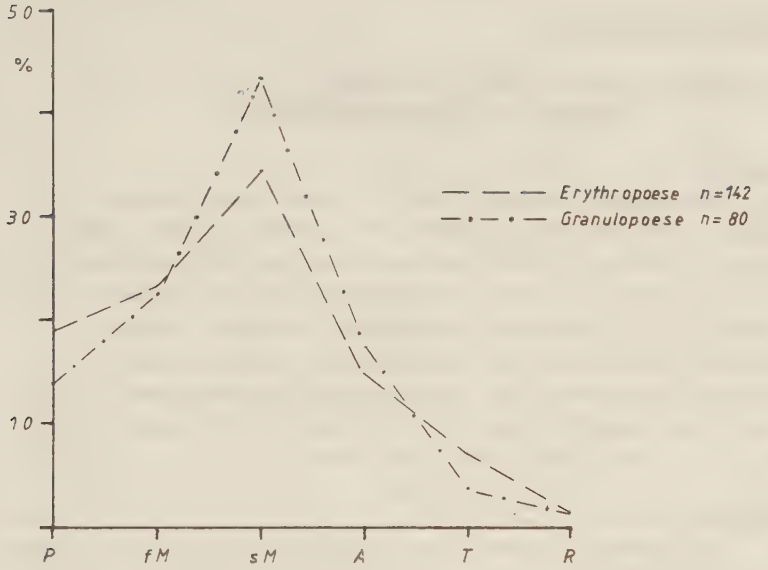


Abb.6: Karyologische Kurven der gezählten KM Mitosen (n)

4.2 Serumzusatzkulturen

4.2.1 Versuch 1 - KM von Fetus 3 (18.SSW) Kontrolle / PRCA-Serum (40%)

Erythropoese:

PRCA - Serumzusatz bewirkt bis 72 h eine signifikante Vermehrung der PE und bE gegenüber der Kontrollkultur (Abb.7). Der relative Zuwachs der PE ist nach 24 h am stärksten und nimmt mit der Dauer der Kultur kontinuierlich ab, während die bE nach 72 h die stärkste Vermehrung erfahren (Abb.9). Eine stärkere Ausreifung der Zusatzkultur gegenüber der Kontrollkultur zeigt sich in einer signifikanten Vermehrung der rE nach 48h (Abb.7). Die rMI sind während der gesamten Kulturdauer bei der Zusatzkultur vermehrt (Abb.8).

Granulopoese:

PRCA - Serumzusatz bewirkt eine Stimulation der Granulopoese, die ab 48 h in voller Ausprägung sichtbar wird (Abb.7). Den stärksten relativen Zuwachs unter PRCA-Serumzugabe (Abb.9) bei den Granuloblasten erfahren bei 24 h die MB, gefolgt von dem signifikanten Zuwachs der eG. Bei 48 h sind die eG bei weitem die Zellgruppe mit dem stärksten relativen Zuwachs. Bei 72 h verstärkt sich dieser Trend. Ferner erfahren die Pro einen signifikanten Zuwachs. Eine verstärkte Ausreifung der Zusatzkultur findet ab 72 h statt, sichtbar an der signifikanten Vermehrung der Stb bei 72 h und der folgenden Vermehrung der Seg bei 120 h (Abb.7). Die wMI bestätigen diesen Trend durch die ständige Erhöhung ab 48 h in der Zusatzkultur gegenüber der Konntrollkultur (Abb.8).

Sonstige Zellen:

Erwähnenswert ist der signifikant vermehrte Anteil der HZB an der Gesamtzellzahl bei 24 h in der Serumzusatzkultur (1 %) im Vergleich zur Kontrollkultur (0,1 %). Alle übrigen Zellen ließen sich sehr schlecht kultivieren und erlauben deshalb keine eindeutige Aussage. Eine Ausnahme bilden die phagozytierenden Retikulumzellen, die in der Zusatzkultur bis 48 h signifikant stärker wuchsen.

Die Signifikanzberechnung ist in Tab. 4 wiedergegeben.

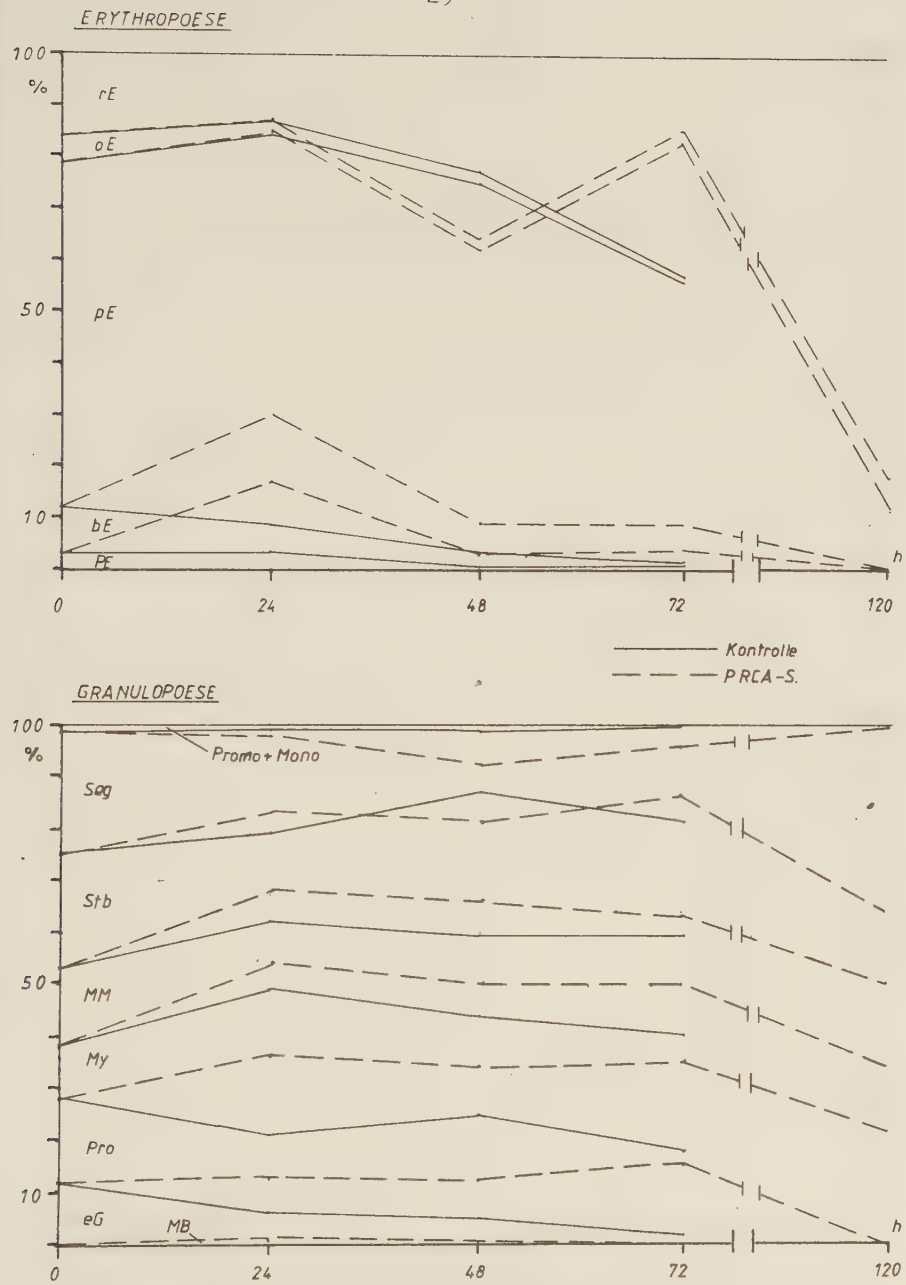


Abb.7: Reifungskurven - Versuch 1 (Fetus 18.SSW)

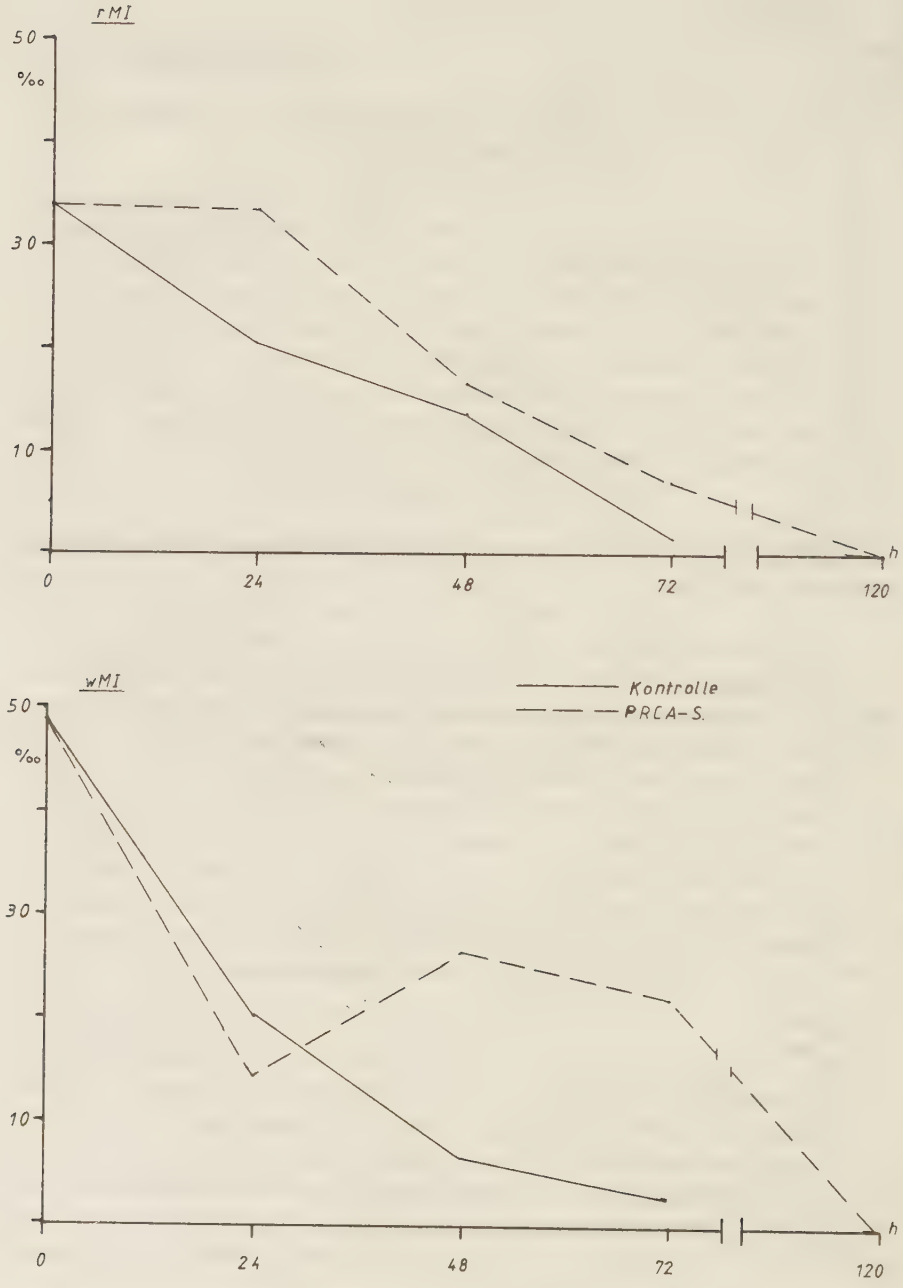


Abb.8: Mitoseindices - Versuch 1 (Fetus 18.SSW)

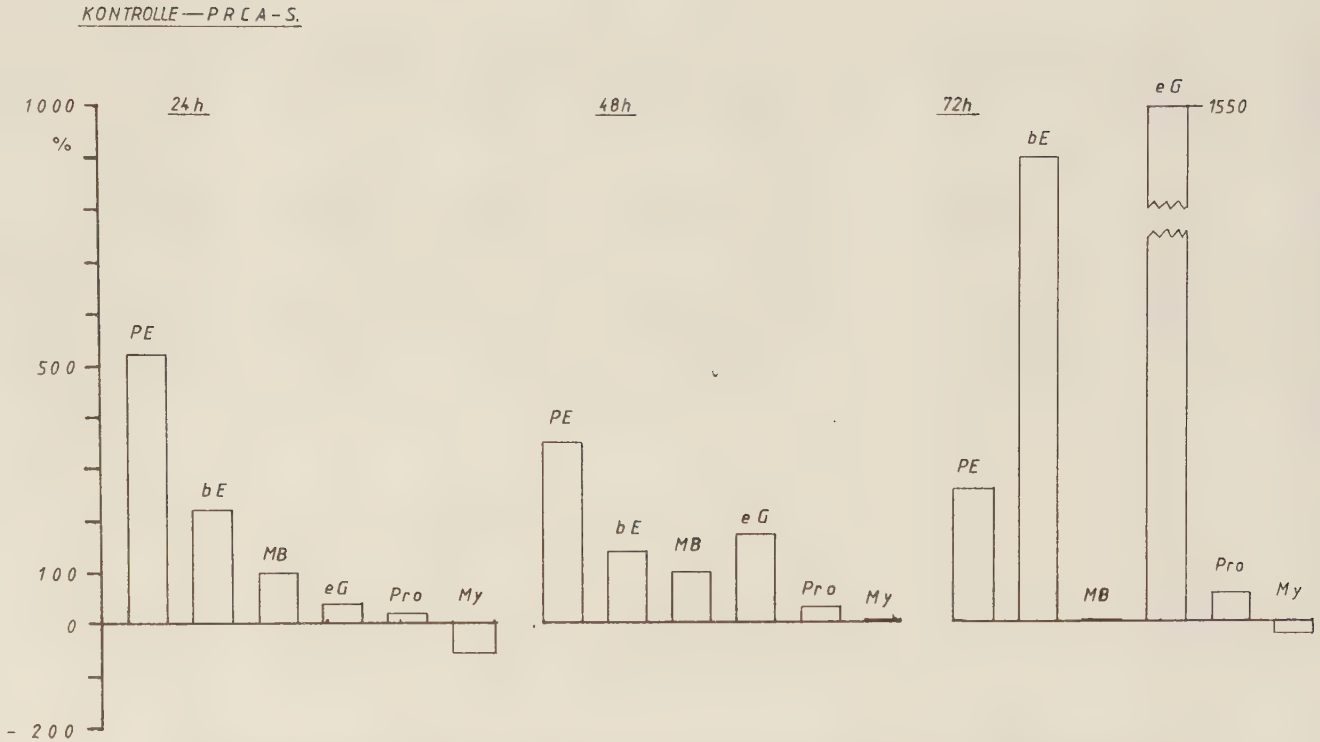


Abb.9: Relativer Zuwachs einzelner Zellgruppen unter PRCA-Serumzugabe - Versuch 1

ZELLART	x^2	p (24h)	Sign	x^2	p (48h)	Sign.
Ob	7,15	0,01>p>0,001	-			
Ok	0,01	>0,05	Ø			
kl Ly	26,42	<0,001	--	5,47	0,05>p>0,01	(-)
gr Ly	6,18	0,05>p>0,01	(+)	2,98	>0,05	Ø
Ly-ä	0,48	>0,05	Ø	3,48	>0,05	Ø
Plb						
Plz	1,03	>0,05	Ø			
kl RZ	4,98	0,05>p>0,01	(+)	3,98	0,05>p>0,01	(+)
gr RZ	4,01	0,05>p>0,01	(+)	0,19	>0,05	Ø
ph RZ	10,24	0,01>p>0,001	+	26,24	<0,001	++
HZB	21,67	<0,001	++	1,99	>0,05	Ø
Megbl	2,06	>0,05	Ø			
Megcy	0,97	>0,05	Ø			
PE	124,6	<0,001	++	7,30	0,01>p>0,001	+
bE	55,56	<0,001	++	8,61	0,01>p>0,001	+
pE	2,16	>0,05	Ø	81,32	<0,001	--
oE	2,17	>0,05	Ø	1,05	>0,05	Ø
rE	4,58	0,05>p>0,01	(+)	7,55	0,01>p>0,001	+
Σ+	66,43	<0,001	++	28,66	<0,001	--
MB	3,09	>0,05	Ø	1,99	>0,05	Ø
eG	3,32	>0,05	Ø	22,70	<0,001	++
Pro	2,40	>0,05	Ø	3,77	>0,05	Ø
My	50,13	<0,001	--	0,02	>0,05	Ø
eMy	5,15	0,05>p>0,01	(+)	1,01	>0,05	Ø
Promo	2,12	>0,05	Ø	5,72	0,05>p>0,01	(+)
MM	2,75	>0,05	Ø	1,79	>0,05	Ø
Stb	8,21	0,01>p>0,001	-	22,22	<0,001	--
Seg	27,32	<0,001	--	0,05	>0,05	Ø
eSeg	0,23	>0,05	Ø			
bSeg						
Mono	1,72	>0,05	Ø	25,50	<0,001	++
Σ+ Prolif.	11,56	<0,001	--	19,21	<0,001	++
Σ+	47,16	<0,001	--	5,49	0,05>p>0,01	(+)

Tab.4: Signifikanzberechnung einzelner Zellgruppen unter PRCA-Serumzugabe - Versuch 1
(Erklärung der Symbole in Kapitel 3.4)

ZELLART	x^2	p (72h)	Sign.
Ob			
Ok			
kl Ly	9,04	0,01> p>0,001	+
gr Ly	1,64	>0,05	Ø
Ly-ä	3,28	>0,05	Ø
Plb			
Plz			
kl RZ			
gr RZ			
ph RZ	17,86	<0,001	--
HZB			
Megbl			
Megcy			
PE	8,40	0,01> p>0,001	+
bE	12,33	<0,001	++
pE	2,32	>0,05	Ø
oE	0,37	>0,05	Ø
rE	133,2	<0,001	--
Σ+	20,60	<0,001	--
MB			
eG	98,32	<0,001	++
Pro	13,66	<0,001	++
My	4,55	0,05> p>0,01	(-)
eMy			
Promo	12,32	<0,001	++
MM	0,43	>0,05	Ø
Stb	11,03	<0,001	++
Seg	12,26	<0,001	--
eSeg			
bSeg			
Mono	19,77	<0,001	++
Σ+ Prolif.	30,59	<0,001	++
Σ+	35,26	<0,001	++

Fortsetzung Tab.4

4.2.2 Versuch 2 - KM von Fetus 4 (19.SSW)
Kontrolle / CML-Serum 1 (85%)

Erythropoese:

CML - Serumzusatz bewirkt bei 24 h keine Stimulation der Erythropoese.Beide Reifungskurven (Abb.10) verlaufen annähernd parallel.Bei CML-Zusatz findet sich lediglich eine nicht signifikante Vermehrung der rE. Bei 48 h findet sich in der Zusatzkultur eine leichte Vermehrung der PE gegenüber dem 24 h Wert, was zusammen mit dem steilen Anstieg des rMI bei 48 h (Abb.11) auf den möglichen Beginn einer Erythropoese-Stimulation zu diesem Zeitpunkt schließen läßt.

Granulopoese:

CML - Serumzusatz bewirkt bei 24 h eine signifikante Vermehrung der MB, eG, Pro und My im Vergleich zur Kontrollkultur. Dieser Vorgang hält tendenziell bis 48 h an (Abb.10) Die stärkste Vermehrung erfahren bei 24 h die MB und eG (Abb.12).

Zusammen mit der Erhöhung des wMI über den gesamten Kulturzeitraum unter CML - Serumzusatz kann von einer Stimulation der Granulopoese gesprochen werden.

Sonstige Zellen:

Erwähnenswert ist lediglich eine signifikante Vermehrung der kl. und gr. Lymphozyten bei CML - Serumzusatz bis 24 h. Einen geringeren Zuwachs erhielten Ly-ä Zellen und gr. Retikulumzellen. Die Zusatzkultur enthielt signifikant weniger phagozytierende Retikulumzellen als die Kontrollkultur.

Die Signifikanzberechnung ist in Tab. 5 wiedergegeben.

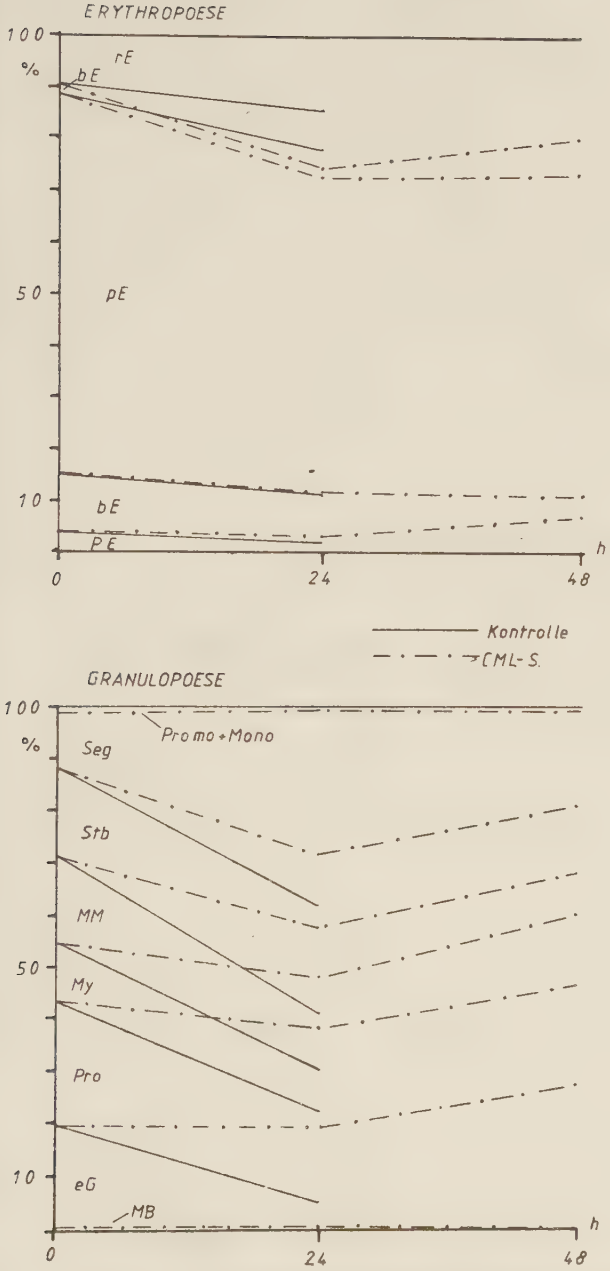


Abb.10: Reifungskurven - Versuch 2 (Fetus 19.SSW)

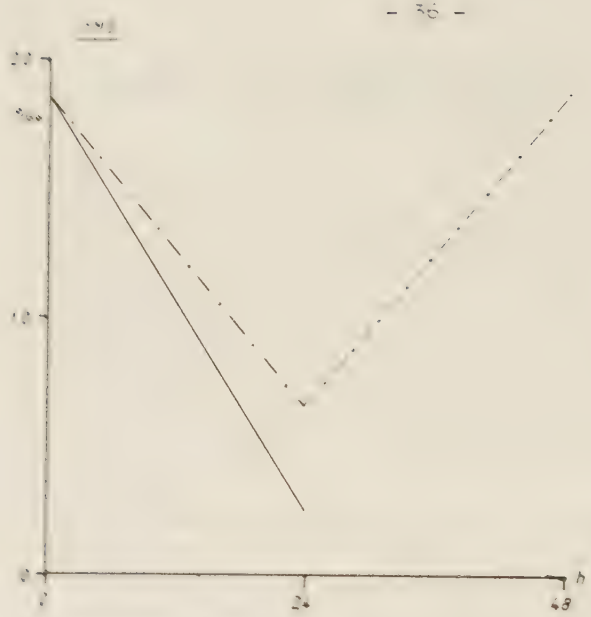


Abb.11: Mitoseindices - Versuch 2 (Fetus 19.SSW)

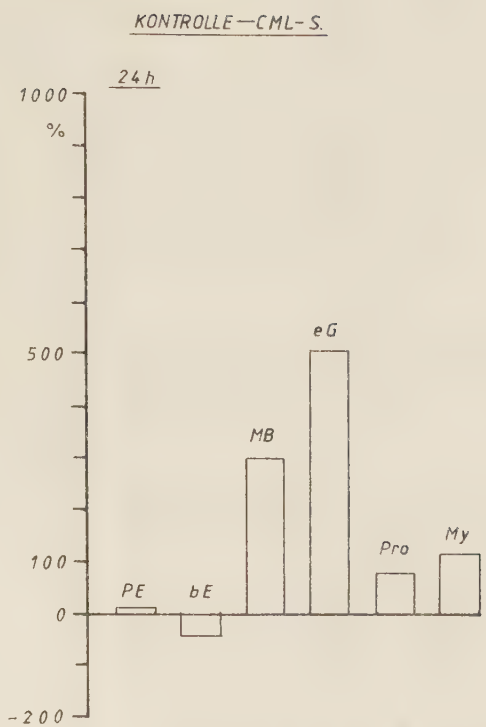


Abb.12: Relativer Zuwachs einzelner Zellgruppen unter CML-Serumzugabe - Versuch 2

ZELLART	χ^2	p (24h)	Sign.
Ob			
Ok			
kl Ly	23,49	<0,001	++
gr Ly	22,38	<0,001	++
Ly-ä	4,44	0,05>p>0,01	(+)
Plb			
Plz			
kl RZ			
gr RZ	3,87	0,05>p>0,01	(+)
ph RZ	16,94	<0,001	--
HZB			
Megbl	1,94	>0,05	ø
Megcy	1,94	>0,05	ø
PE	0,11	>0,05	ø
bE	17,27	<0,001	--
pE	155,7	<0,001	--
oE	61,65	<0,001	--
rE	0,49	>0,05	ø
Σ+	227,5	<0,001	--
MB	5,81	0,05>p>0,01	(+)
eG	89,78	<0,001	++
Pro	16,83	<0,001	++
My	14,83	<0,001	++
eMy	0,17	>0,05	ø
Promo	0,17	>0,05	ø
MM	5,13	0,05>p>0,01	(+)
Stb	0,95	>0,05	ø
Seg	3,74	>0,05	ø
eSeg	2,95	>0,05	ø
bSeg	2,91	>0,05	ø
Mono	2,90	>0,05	ø
Σ+ Prolif.	118,7	<0,001	++
Σ+	104,9	>0,05	ø

Tab.5: Signifikanzberechnung einzelner Zellgruppen unter CML-Serumzugabe - Versuch 2

4.2.3 Versuch 3 - KM von Fetus 5 (20.SSW)
Kontrolle / PRCA-Serum (40%)

Erythropoese:

PRCA-Serumzusatz bewirkt eine signifikante Vermehrung der PE, bE und pE bis 24 h im Vergleich zur Kontrollkultur. Bei 72h findet vor allem eine verstärkte Ausreifung der Zusatzkultur statt, erkenntlich an der signifikanten Vermehrung der rE (Abb.13). Zusammen mit der Erkenntnis, daß in der Zusatzkultur über den gesamten Kulturzeitraum der rMI erhöht ist (Abb.14), kann hieraus auf eine Stimulation der Erythropoese durch PRCA-Serum geschlossen werden.

Granulopoese:

PRCA-Serumzusatz bewirkt erst ab 72h eine signifik. Vermehrung der eG und Pro im Vergleich zur Kontrollkultur (Abb.15). Trotz fehlender Auswertung der Kontrollkultur wegen mangelnder Qualität bei 48 h darf aus der Reifungskurve der Granulopoese (Abb.13) und den wMI (Abb.14) auf den Beginn einer Stimulation der Granulopoese durch PRCA-Serum schon ab 48 h geschlossen werden. Zu diesem Zeitpunkt sind nämlich die MB, eG und Pro leicht erhöht im Vergleich zum 24 h Wert. Auch die wMI fallen nach 24 h geringer ab, um nach 48 h wieder anzusteigen.

Herausragend ist außerdem eine signifikante Vermehrung der Seg bei 72 h in der Serumzusatzkultur (Abb. 13).

Sonstige Zellen:

Erwähnenswert ist lediglich eine signifikante Vermehrung der phagozytierenden Retikulumzellen in der Zusatzkultur bei 24 h. Alle übrigen Zellen ließen sich sehr schlecht kultivieren und erlauben deshalb keine eindeutige Aussage.

Die Signifikanzberechnung ist in Tab.6 wiedergegeben.

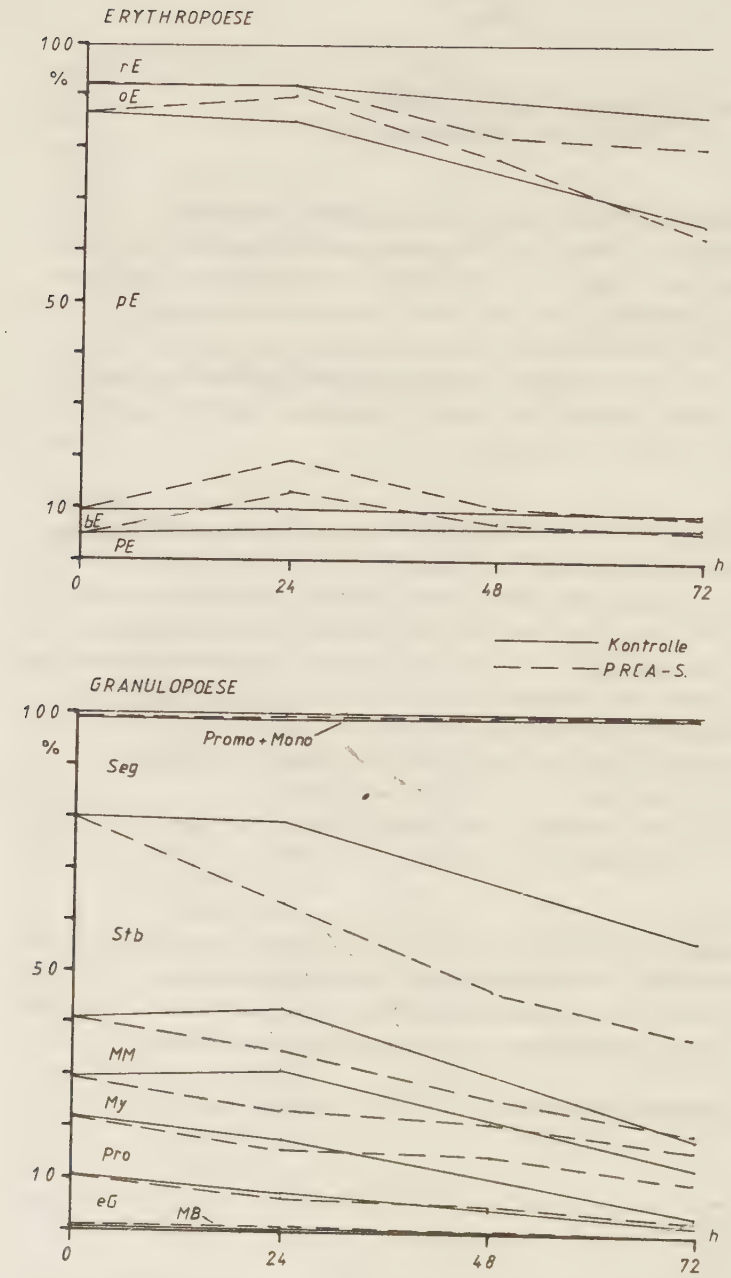


Abb.13: Reifungskurven - Versuch 3 (Fetus 20.SSW)

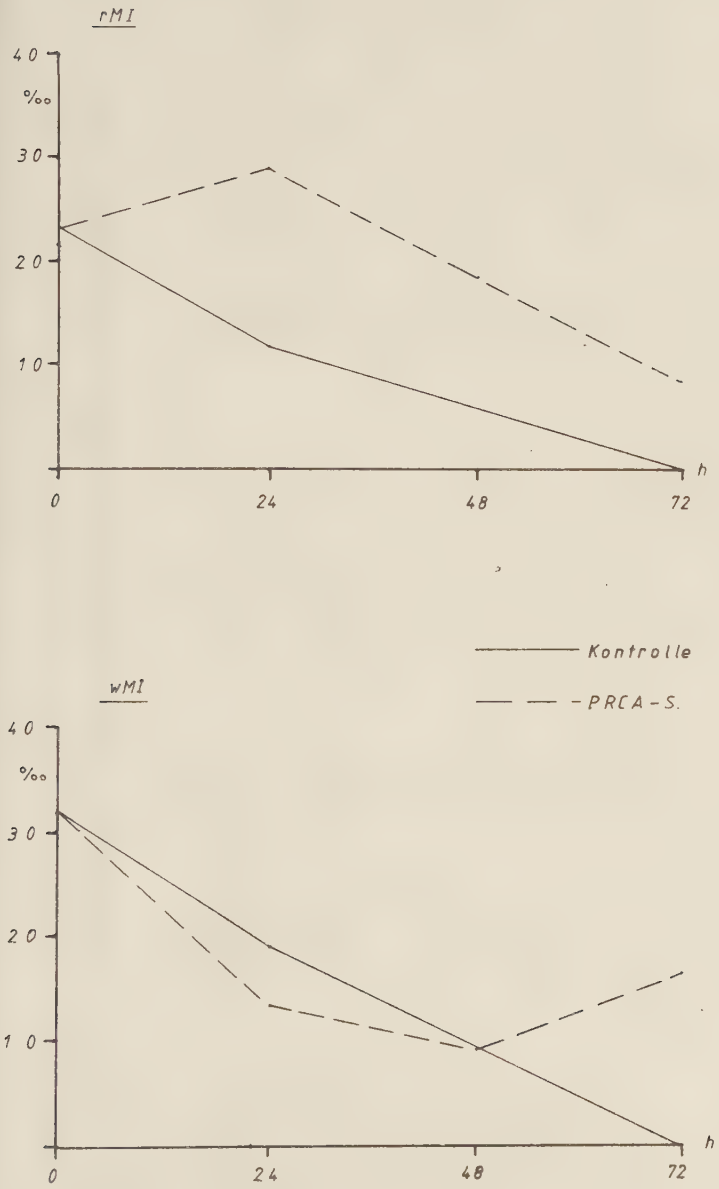


Abb.14: Mitoseindices - Versuch 3 (Fetus 20.SSW)

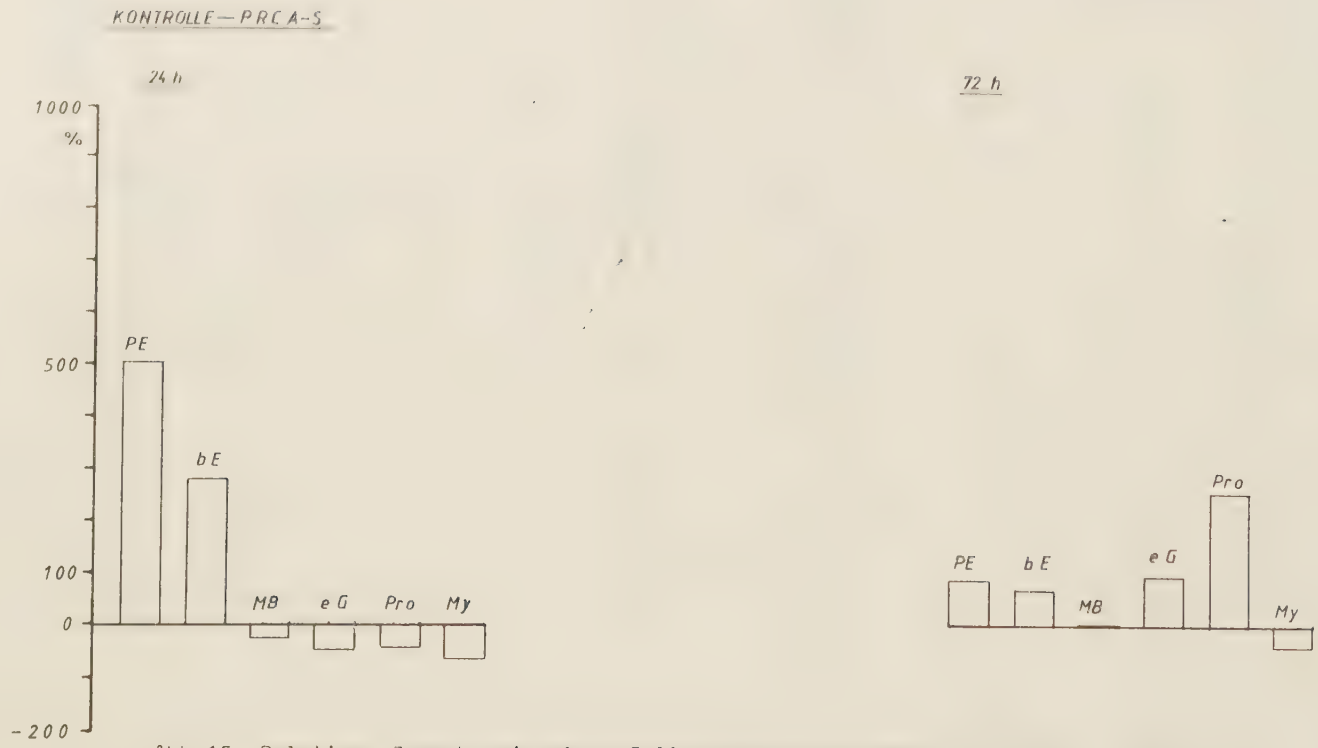


Abb.15: Relativer Zuwachs einzelner Zellgruppen unter PRCA-Serumzugabe - Versuch 3

ZELLART	χ^2	p (24h)	Sign.	χ^2	p (72h)	Sign.
Ob						
Ok						
kl Ly	6,80	0,01>p>0,001	+	16,72	<0,001	--
gr Ly	3,47	>0,05	ø			
Ly-ä	0,19	>0,05	ø	4,97	0,05>p>0,01	(-)
Plb						
Plz						
kl RZ	2,76	>0,05	ø			
gr RZ						
ph RZ	14,20	<0,001	++	0,02	>0,05	ø
HZB						
Megbl						
Megcy						
PE	40,53	<0,001	++	5,88	0,05>p>0,01	(+)
bE	37,26	<0,001	++	0,40	>0,05	ø
pE	168,9	<0,001	++	19,23	<0,001	++
oE	0,92	>0,05	ø	2,40	>0,05	ø
rE	17,60	<0,001	++	12,58	<0,001	++
Σ+	281,3	<0,001	++	38,16	<0,001	++
MB	0,09	>0,05	ø			
eG	13,39	<0,001	--	4,65	0,05>p>0,01	(+)
Pro	14,21	<0,001	--	22,54	<0,001	++
My	59,99	<0,001	--	5,76	0,05>p>0,01	(-)
eMy	3,07	>0,05	ø			
Promo	9,58	0,01>p>0,001	-	0,33	>0,05	ø
MM	23,26	<0,001	--	10,15	0,01>p>0,001	-
Stb	101,2	<0,001	--	108,4	<0,001	--
Seg	9,58	0,01>p>0,001	+	28,92	<0,001	++
eSeg	8,34	0,01>p>0,001	-	7,41	0,01>p>0,001	+
bSeg						
Mono	0,01	>0,05	ø	0,33	>0,05	ø
Σ+ Prolif.	138,4	<0,001	--	0,03	>0,05	ø
Σ+	313,0	<0,001	--	5,21	0,05>p>0,01	(-)

Tab. 6: Signifikanzberechnung einzelner Zellgruppen unter PRCA-Serumzugabe - Versuch 3

4.2.4 Versuch 4 - KM von Fetus 6 (21.SSw)
Kontrolle / PRCA-Serum (40%)
/ CML-Serum 2 (100%)

Erythropoese:

PRCA-Serumzusatz bewirkt bei 24 h eine signifikante Vermehrung der PE und rE (Abb.16, Abb.18). Dieses, zusammen mit dem steilen Anstieg des rMI bei 24 h (Abb17), läßt auf eine Stimulation der Erythropoese durch PRCA-Serum schließen.

CML-Serumzusatz hat außer auf die rE keinen signifikanten Stimulationseffekt auf die Erythropoese (Abb.16). Auch die rMI der Zusatz- und Kontrollkulturen (Abb.17) sind annähernd identisch.

Granulopoese:

PRCA-Serumzusatz bewirkt keine signifikante Stimulation der Granulopoese bei 24 h (Abb.16,Abb18).Auch die wMI (Abb.17) sinken in 24 h ab.

CML - Serumzusatz bewirkt eine Vermehrung der MB, eG und Pro,wobei diejenige der beiden letztgenannten Zellgruppen signifikant ist (Abb. 16, Abb. 18) . Der wMI steigt bei 24 h deutlich an (Abb.17). Dieses läßt auf eine Stimulation von CML-Serum auf die Granulopoese in 24h schließen.

Sonstige Zellen:

Erwähnenswert ist lediglich eine signifikante Vermehrung der phagozytierenden Retikulumzellen in beiden Zusatzkulturen gegenüber der Kontrolle bei 24 h. Alle übrigen Zellen ließen sich sehr schlecht kultivieren und erlauben deshalb keine eindeutige Aussage.

Die Signifikanzberechnung ist in Tab. 7 und Tab. 8 wiedergegeben.

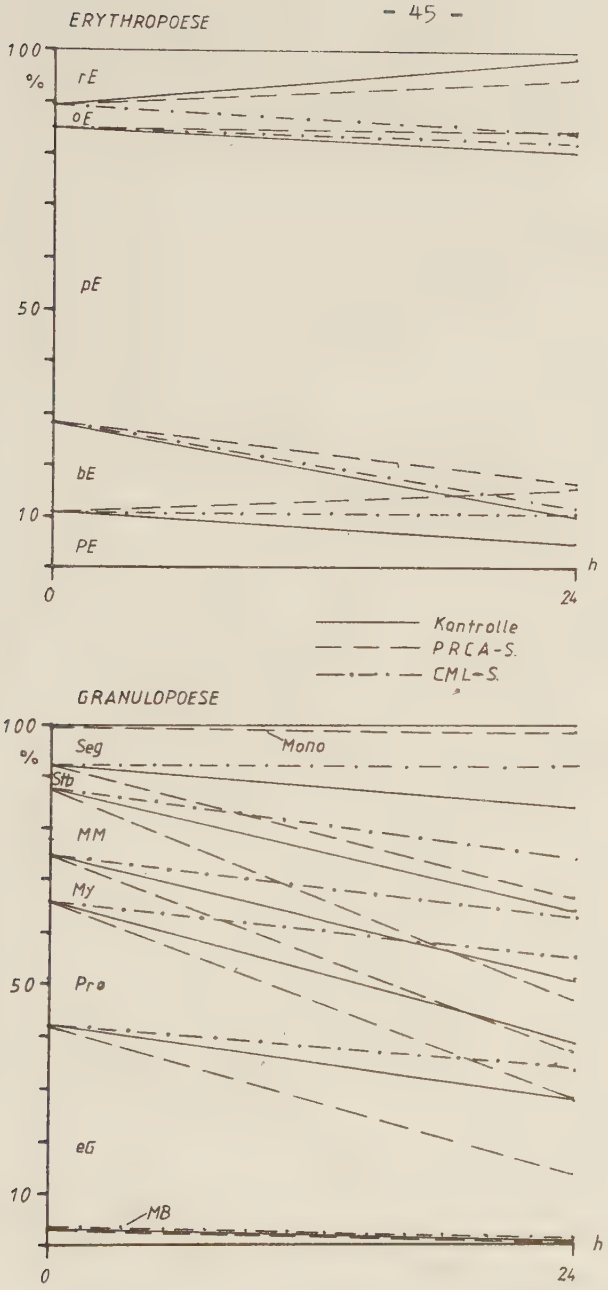
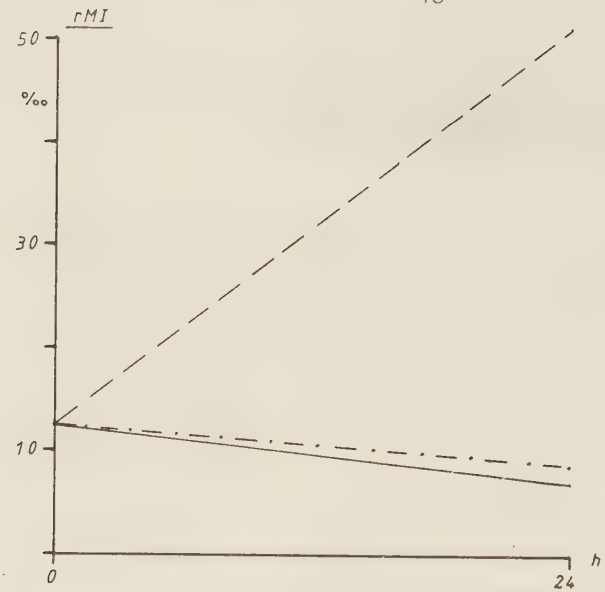


Abb.16: Reifungskurven - Versuch 4 (Fetus 21.SSW)



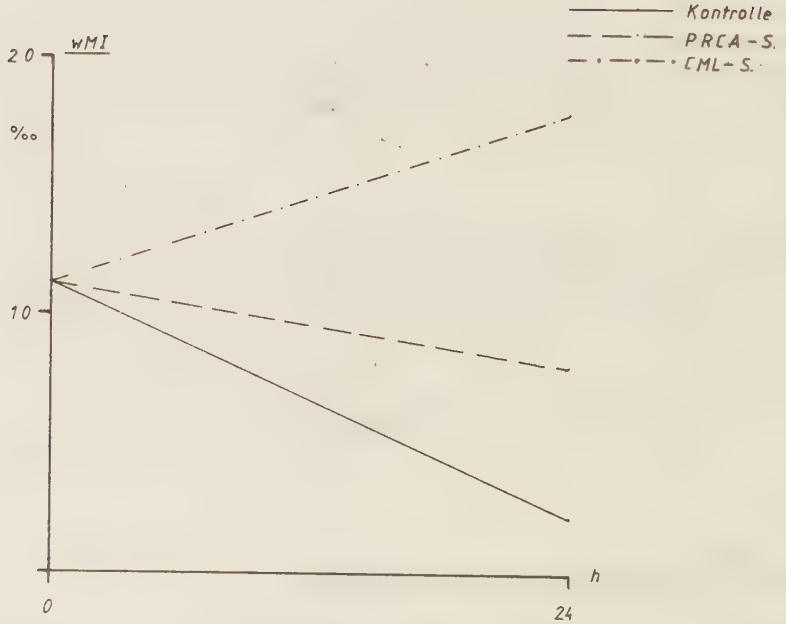
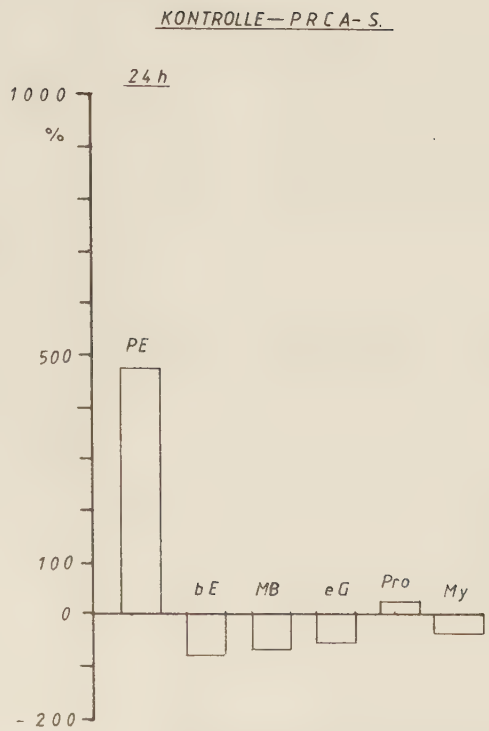


Abb.17: Mitoseindices - Versuch 4 (Fetus 21.SSW)



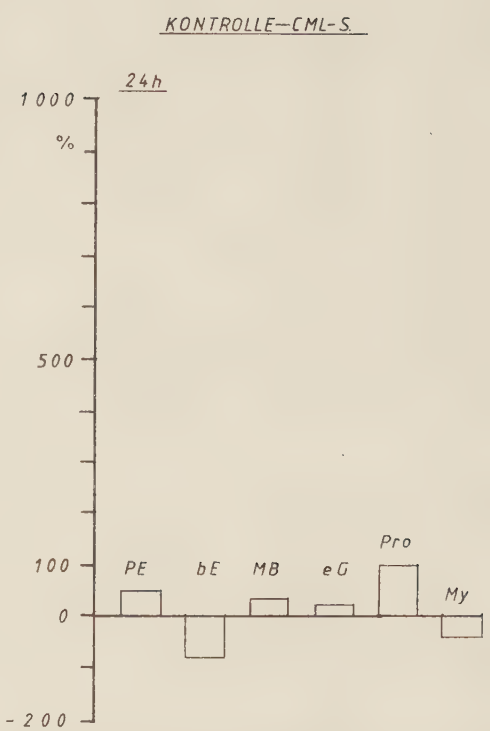


Abb.18: Relativer Zuwachs einzelner Zellgruppen unter PRCA- und CML-Serumzugabe - Versuch 4

ZELLART	x^2	p (24 h)	Sign
Ob	1,84	>0,05	ø
Ok			
kl Ly	76,86	<0,001	--
gr Ly	0,81	>0,05	ø
Ly-ä	0,73	>0,05	ø
Plb			
Plz			
kl RZ			
gr RZ	2,07	>0,05	ø
ph RZ	100,1	<0,001	++
HZB			
Megbl	0,97	>0,05	ø
Megcy			
PE	27,83	<0,001	++
bE	2,94	>0,05	ø
pE	29,94	<0,001	++
oE	0,43	>0,05	ø
rE	11,85	<0,001	++
Σ+	52,35	<0,001	++
MB	1,10	>0,05	ø
eG	85,61	<0,001	--
Pro	6,04	0,05>p>0,01	(+)
My	12,50	<0,001	--
eMy			
Promo	2,63	>0,05	ø
MM	5,71	0,05>p>0,01	(-)
Stb	0,60	>0,05	ø
Seg	105,6	<0,001	++
eSeg	27,03	<0,001	--
bSeg			
Mono	3,42	>0,05	ø
Σ+ Prolif.	70,26	<0,001	--
Σ+	3,61	>0,05	ø

Tab.7: Signifikanzberechnung einzelner Zellgruppen unter PRCA-Serumzugabe - Versuch 4

ZELLART	x^2	p (24h)	Sign.
Ob			
Ok			
kl Ly	0,81	>0,05	ø
gr Ly	0,84	>0,05	ø
Ly-ä	0,20	>0,05	ø
Plb			
Plz			
kl RZ			
gr RZ	2,12	>0,05	ø
ph RZ	29,62	<0,001	++
HZB			
Megbl			
Megcy			
PE	1,06	>0,05	ø
bE	4,86	0,05>p>0,01	(-)
pE	3,04	>0,05	ø
oE	23,16	<0,001	--
rE	14,35	<0,001	++
Σ+	4,82	0,05>p>0,01	(-)
MB	0,19	>0,05	ø
eG	11,65	<0,001	++
Pro	60,93	<0,001	++
My	18,16	<0,001	--
eMy			
Promo	1,79	>0,05	ø
MM	1,49	>0,05	ø
Stb	1,13	>0,05	ø
Seg	33,40	<0,001	--
eSeg	19,71	<0,001	--
bSeg			
Mono	0,15	>0,05	ø
Σ+ Prolif.	25,85	<0,001	++
Σ+	0,37	>0,05	ø

Tab.8: Signifikanzberechnung einzelner Zellgruppen unter CML-Serumzugabe - Versuch 4

4.2.5 Versuch 5 - KM von Fetus 7 (23.SSW) Kontrolle / PRCA-Serum (40%)

Erythropoese:

PRCA-Serumzusatz bewirkt bei 24 h eine stat. signifikante Vermehrung der PE und bE im Vergleich zur Kontrollkultur (Abb.19,Abb.21). Nach 24 h findet eine Ausreifung der Zusatzkultur statt, erkenntlich an dem steigenden Anteil der oE bei 48 h und der Vermehrung der rE bei 72 h. Aus diesen Erkenntnissen, zusammen mit dem in der Zusatzkultur höheren rMI im Vergleich zur Kontrolle (Abb.20), darf auf einen die Erythropoese stimulierenden Effekt des PRCA-Serums geschlossen werden.

Granulopoese:

PRCA-Serumzusatz bewirkt bei 24 h eine Vermehrung der MB und eG im Vergleich zur Kontrollkultur, wobei die der letztgenannten Zellgruppe statistisch signifikant ist. Nach 24h findet auch hier eine Ausreifung der Zusatzkultur statt, erkenntlich an dem steigenden Anteil der My bei 48 h und einer Vermehrung der My, MM und Seg bei 72 h (Abb.19,Abb.21). Die wMI sind bei 24 h leicht erhöht in der Zusatzkultur gegenüber der Kontrolle und steigen in jener kontinuierlich bis 72h (Abb.20). Diese Daten weisen auf eine Stimulation der Granulopoese durch PRCA-Serum hin.

Sonstige Zellen:

Erwähnenswert ist lediglich eine signifikante Vermehrung der phagozytierenden Retikulumzellen in der Zusatzkultur bei 24 h. Alle übrigen Zellen ließen sich sehr schlecht kultivieren und erlauben deshalb keine eindeutige Aussage.

Die Signifikanzberechnung ist in Tab. 9 wiedergegeben.

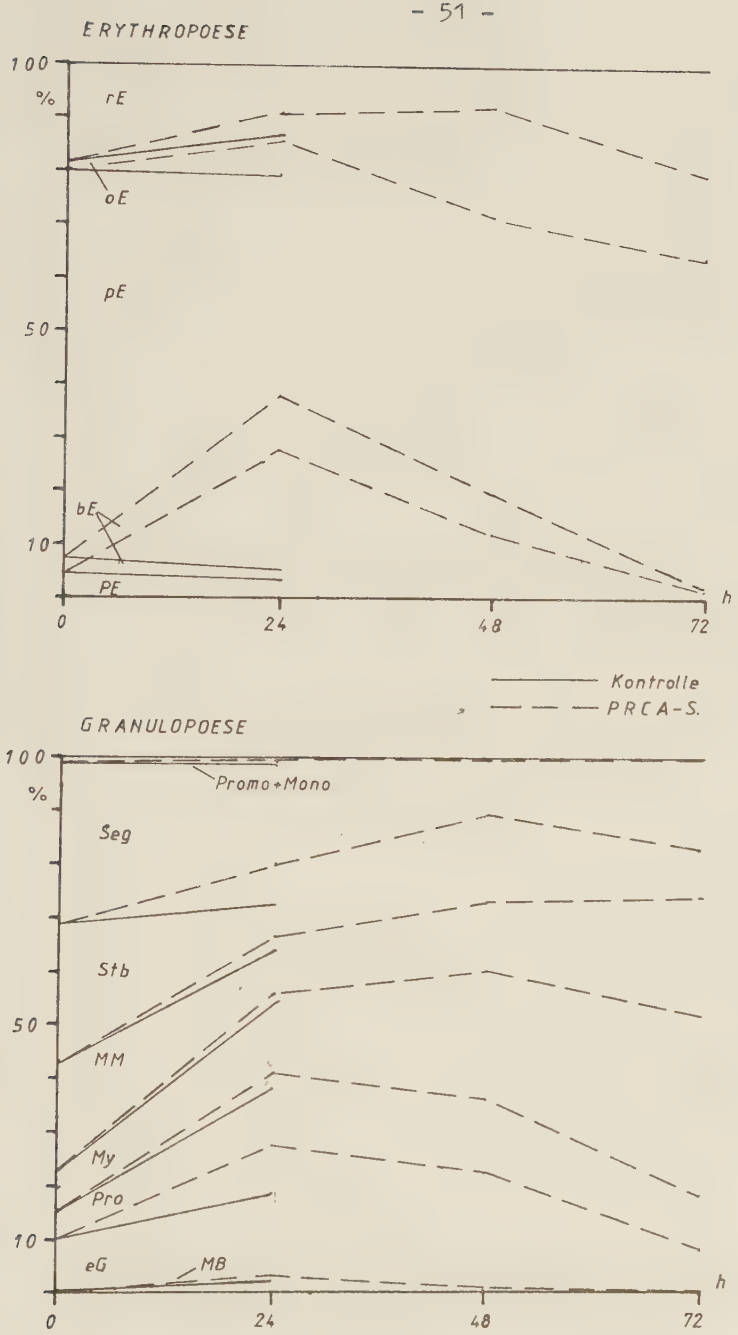


Abb.19: Reifungskurven - Versuch 5 (Fetus 23.SSW)

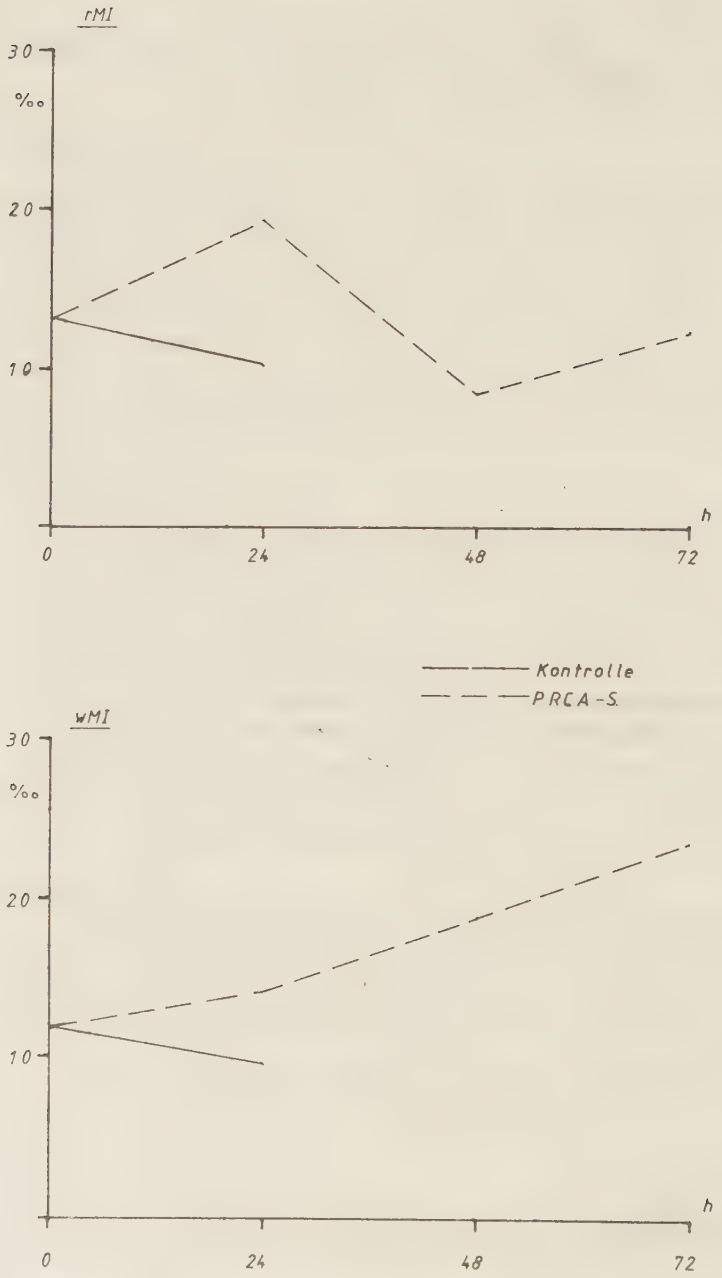


Abb.20: Mitoseindices - Versuch 5 (Fetus 23.SSW)

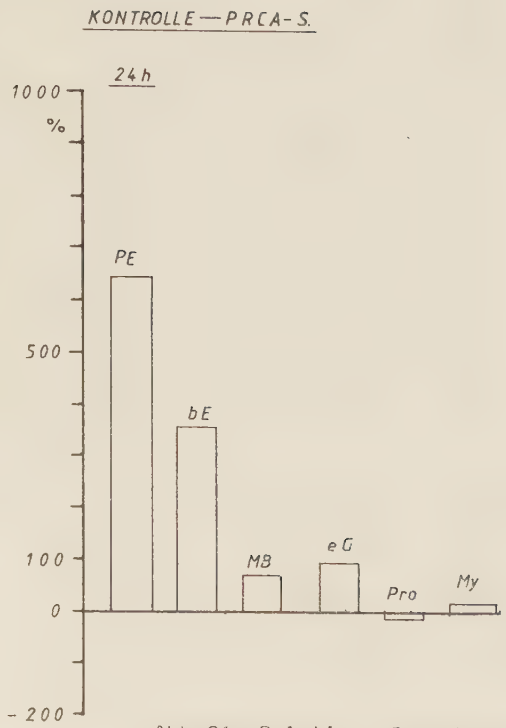


Abb.21: Relativer Zuwachs einzelner Zellgruppen unter PRCA-Serumzugabe - Versuch 5

ZELLART	x^2	p (24 h)	Sign.
Ob	2,22	>0,05	ø
Ok	1,89	>0,05	ø
kl Ly	35,94	<0,001	--
gr Ly	4,89	0,05>p>0,01	(+)
Ly-ä			
Plb			
Plz			
kl RZ			
gr RZ			
ph RZ	22,8	<0,001	++
HZB			
Megbl			
Megcy	0,01	>0,05	ø
PE	175,0	<0,001	++
bE	41,83	<0,001	++
pE	69,70	<0,001	--
oE	2,08	>0,05	ø
rE	7,96	0,01>p>0,001	-
Σ+	0,07	>0,05	ø
MB	1,99	>0,05	ø
eG	24,76	<0,001	++
Pro	0,84	>0,05	ø
My	1,04	>0,05	ø
eMy			
Promo	0,09	>0,05	ø
MM	2,23	>0,05	ø
Stb	11,10	<0,001	++
Seg	0,28	>0,05	ø
eSeg	2,18	>0,05	ø
bSeg			
Mono	0,09	>0,05	ø
Σ+ Prolif.	16,51	<0,001	++
Σ+	22,49	<0,001	++

Tab.9: Signifikanzberechnung einzelner Zellgruppen unter PRCA-Serumzugabe - Versuch 5

4.2.6 Versuch 6 - KM von Fetus 8 (24.SSW)
Kontrolle / PRCA-Serum (40%)
/ CML-Serum 3 (70%)

Erythropoese:

PRCA-Serumzusatz bewirkt bei 24h eine eindeutig signifikante Vermehrung der PE, bE und pE im Vergleich zur Kontrolle (Abb.22,Abb.24). Bei 48 h sind die PE, bE und rE eindeutig signifikant vermehrt.Im weiteren Kulturverlauf bleibt die Reifungskurve der PRCA-Serumzusatzkultur annähernd konstant. Die rMI der Zusatzkultur sind während der gesamten Kulturdauer eindeutig gegenüber denen der Kontrollkultur erhöht (Abb.23). Somit kann wohl von einem stimulierenden Effekt des PRCA-Serums auf die Erythropoese gesprochen werden.

CML-Serumzusatz besitzt ebenfalls einen auf die Vermehrung der PE und bE gerichteten signifikanten Effekt, der jedoch bei 48 h größer ist als bei 24 h (Abb.22, Abb.25). Bei 48 h sind auch die rE signifikant in der Zusatzkultur gegenüber der Kontrolle vermehrt. Der Anteil der rE nimmt mit fortlaufender Kulturdauer weiter zu. Die Kurve der wMI der CML-Serumzusatzkultur liegt ständig über der der Kontrollkultur (Abb.23). Somit kann von einem bei 24 h beginnenden stimulierenden Effekt von CML-Serum auf die Erythropoese gegenüber den Kontrollen gesprochen werden.

Granulopoese:

PRCA-Serumzusatz besitzt bei 24 h keinen Effekt auf die Vermehrung der granulopoetischen Zellen. Bei 48 h tritt dann eine signifikante Vermehrung der MB und eG in der PRCA-Serumzusatzkultur auf (Abb.22,Abb.24).Der relative Zuwachs der MB übertrifft den der eG zu diesem Zeitpunkt. Im weiteren Kulturverlauf macht die Zusatzkultur einen Reifungsvorgang durch, erkenntlich an der Vermehrung der MM und Stb bei 96 h. Die wMI der PRCA-Serumzusatzkultur übersteigen die der Kontrolle ab 48 h (Abb.23). Diese Daten sprechen für eine Stimulation der Granulopoese durch PRCA-Serum ab 48 h.

CML-Serumzusatz bewirkt bei 24 h eine Vemehrung der MB, eG und Pro im Vergleich zur Kontrolle, wobei die Vermehrung

der beiden letztgenannten Zellgruppen signifikant ist. Der stimulierende Effekt auf die MB und eG nimmt bei 48 h sogar noch zu (Abb.22,Abb.25). Gegen Ende der Kulturdauer n. 96h findet eine Ausreifung der Granulopoese statt, erkenntlich an der Vermehrung der MM, Stb und Seg im Vergleich zum vorhergehenden Kulturtag. Die wMI der CML-Serumzusatzkultur liegen ständig über denen der Kontrollkultur (Abb.23). Somit kann bis 96 h von einem stimulierenden Effekt von CML-Serum auf die Granulopoese gesprochen werden.

Sonstige Zellen:

Erwähnenswert ist lediglich eine signifikante Vermehrung der phagozytierenden Retikulumzellen in beiden Zusatzkulturen im Vergleich zur Kontrolle ab 48 h. Alle übrigen Zellen ließen sich sehr schlecht kultivieren und erlauben deshalb keine eindeutige Aussage.

Hervorzuheben ist die Kultivierbarkeit der erythropoetischen und granulopoetischen Zellen in den Serumzusatzkulturen bis 96 h, während diese Zellen in den serumfreien Kontrollkulturen nur bis 48 h kultiviert werden konnten.

Die Signifikanzberechnung ist in Tab.10 und Tab.11 wiedergegeben.

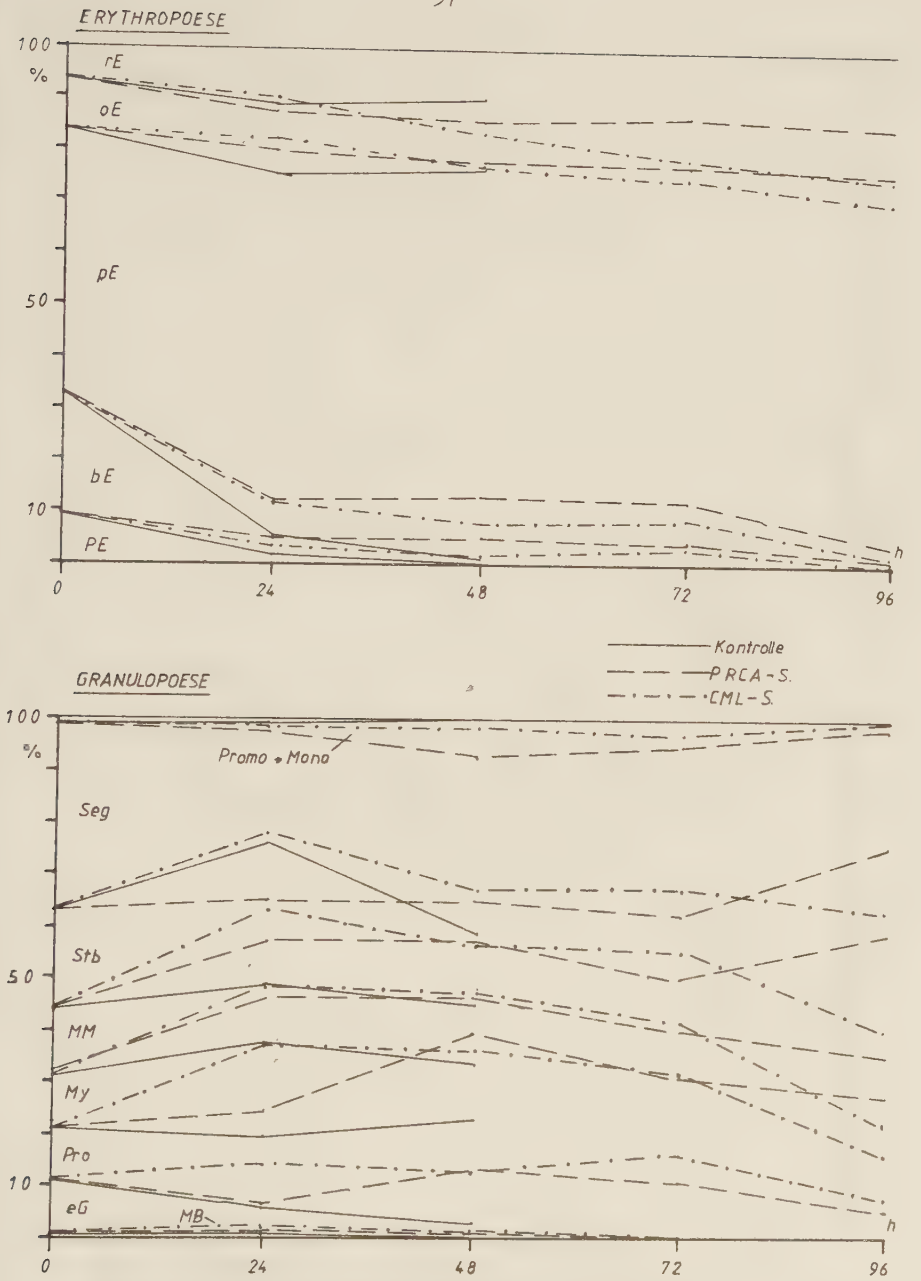


Abb.22: Reifungskurven - Versuch 6 (Fetus 24.SSW)

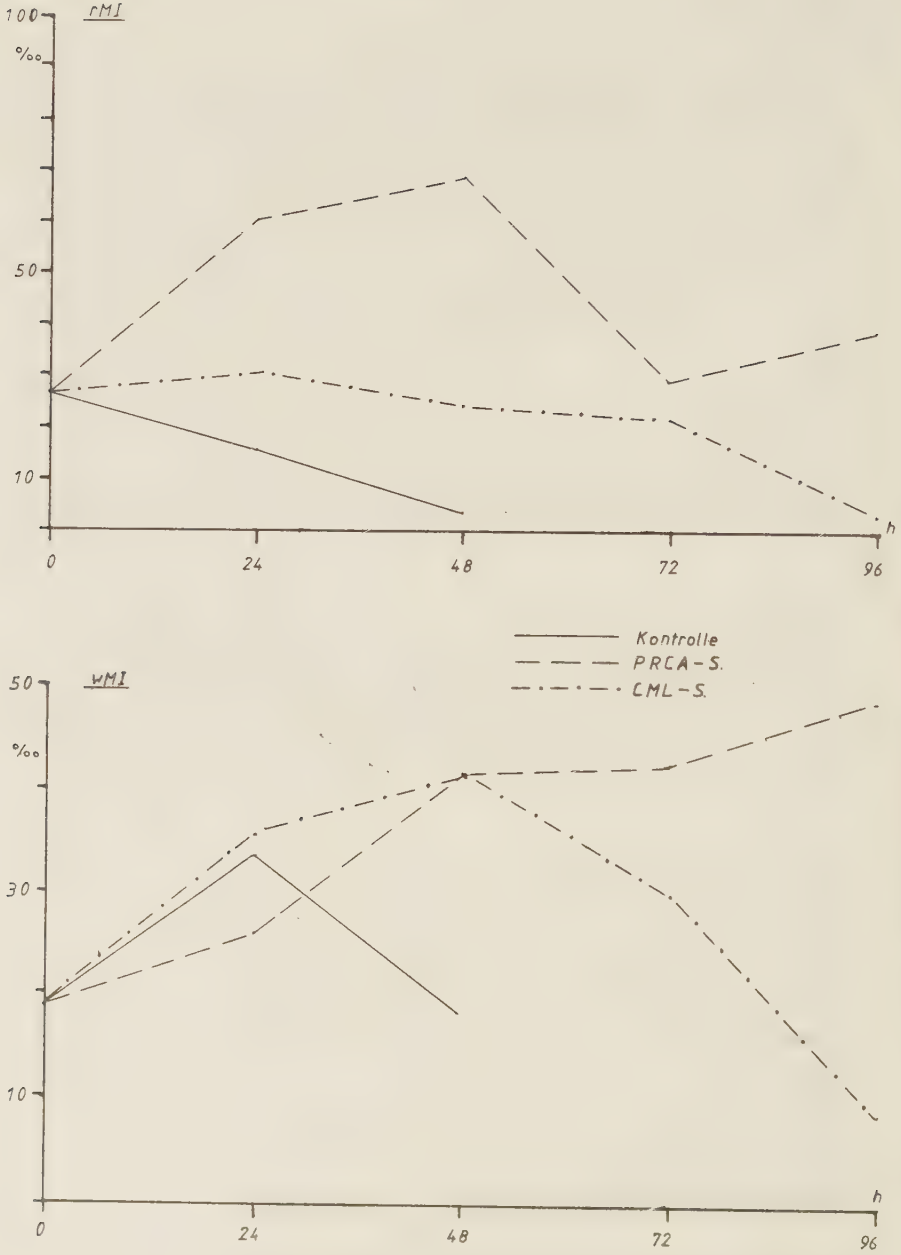


Abb.23: Mitoseindices - Versuch 6 (Fetus 24.SSW)

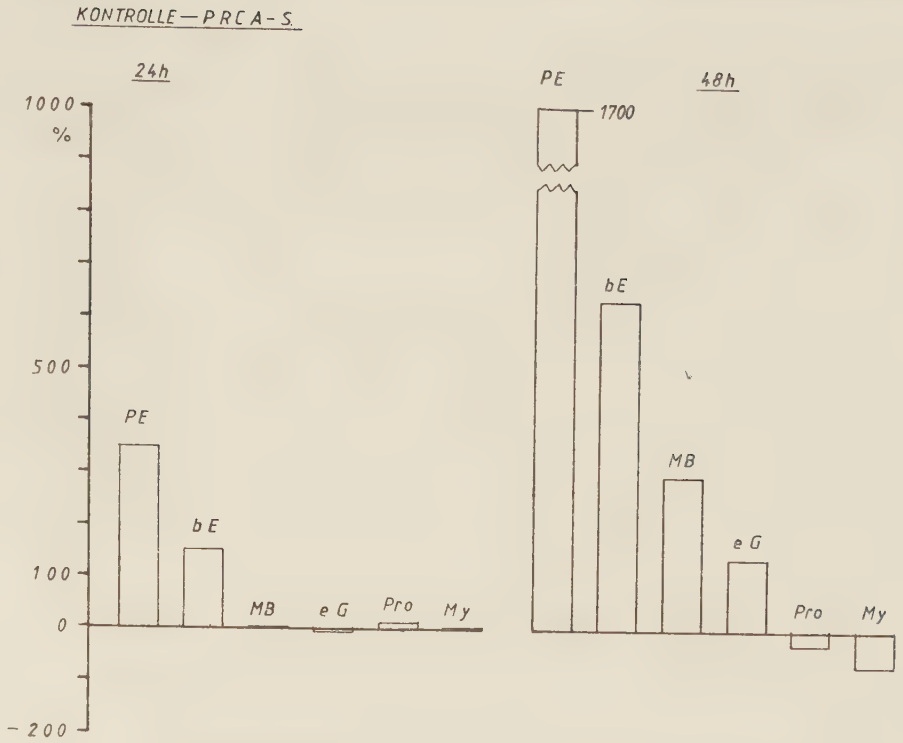


Abb.24: Relativer Zuwachs einzelner Zellgruppen unter PRCA-Serumzugabe - Versuch 6

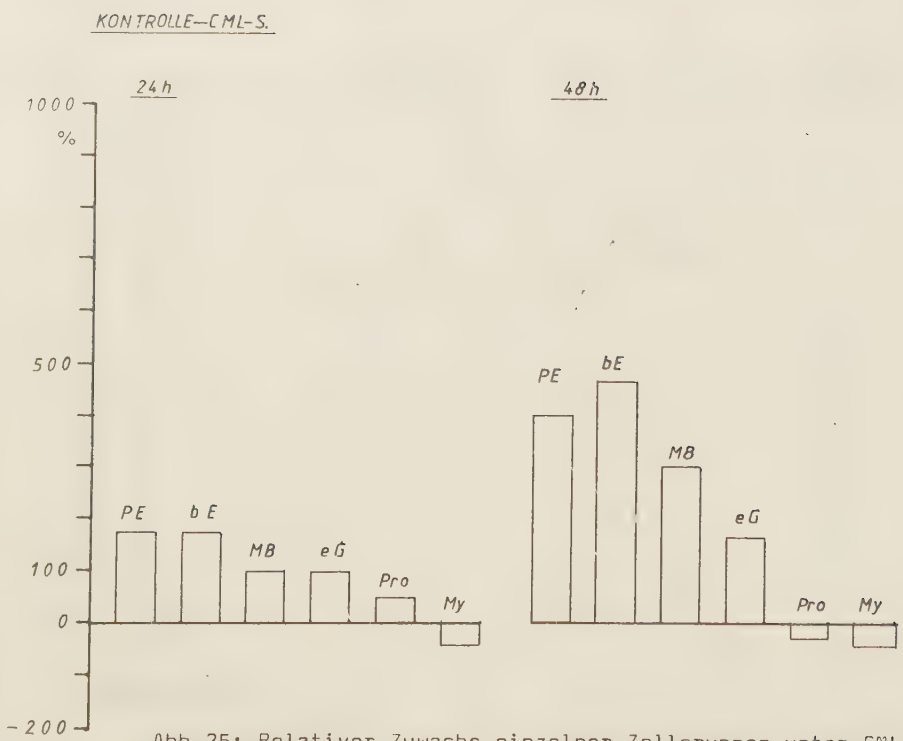


Abb.25: Relativer Zuwachs einzelner Zellgruppen unter CML-Serumzugabe - Versuch 6

ZELLART	x^2	p (24h)	Sign.	x^2	p (48h)	Sign.
Ob						
Ok	2,09	>0,05	ø			
kl Ly	1,23	>0,05	ø	9,30	0,01>p>0,001	+
gr Ly	0,82	>0,05	ø	23,09	<0,001	++
Ly-ä	11,58	<0,001	--	25,35	<0,001	++
Plb						
Plz	2,88	>0,05	ø			
kl RZ	2,88	>0,05	ø			
gr RZ						
ph RZ	9,75	0,01>p>0,001	-	209,1	<0,001	++
HZB	7,68	0,01>p>0,001	+			
Megbl	3,84	>0,05	ø	10,01	0,01>p>0,001	+
Megcy	2,88	>0,05	ø	19,05	<0,001	++
pE	17,66	<0,001	++	34,22	<0,001	++
bE	11,81	<0,001	++	29,17	<0,001	++
pE	11,08	<0,001	++	0,29	>0,05	ø
oE	4,18	0,05>p>0,01	(-)	5,38	0,05>p>0,01	(-)
rE	4,96	0,05>p>0,01	(+)	8,37	0,01>p>0,001	+
Σ+	24,89	<0,001	++	5,41	0,05>p>0,01	(+)
MB	0,01	>0,05	ø	5,98	0,05>p>0,01	(+)
eG	0,01	>0,05	ø	19,71	<0,001	++
Pro	2,02	>0,05	ø	6,48	0,05>p>0,01	(-)
My	0,03	>0,05	ø	38,84	<0,001	--
eMy	2,88	>0,05	ø	1,99	>0,05	ø
Promo	1,17	>0,05	ø	22,08	<0,001	++
MM	0,46	>0,05	ø	13,14	<0,001	--
Stb	118,4	<0,001	--	61,31	<0,001	--
Seg	4,99	0,05>p>0,01	(+)	159,3	<0,001	--
eSeg	15,38	<0,001	++	12,01	<0,001	++
bSeg						
Mono	11,53	<0,001	++	27,13	<0,001	++
Σ+ Prolif.	0,71	>0,05	ø	13,84	<0,001	--
Σ+	7,56	0,01>p>0,001	-	213,3	<0,001	--

Tab.10: Signifikanzberechnung einzelner Zellgruppen unter PRCA-Serumzugabe - Versuch 6

ZELLART	χ^2	p (24h)	Sign.	χ^2	p (48h)	Sign
Ob						
Ok	2,08	>0,05	Ø			
kl Ly	2,83	>0,05	Ø	25,23	<0,001	++
gr Ly	2,61	>0,05	Ø	5,15	0,05>p>0,01	(+)
Ly-ä	4,60	0,05>p>0,01	(-)	8,00	0,01>p>0,001	+
Plb						
Plz	4,83	0,05>p>0,01	(+)			
kl RZ						
gr RZ	3,87	0,05>p>0,01	(+)			
ph RZ	18,96	<0,001	--	303,9	<0,001	++
HZB						
Megbl	7,73	0,01>p>0,001	+	3,09	>0, 05	Ø
Megcy	3,86	0,05>p>0,01	(+)	8,25	0,01>p>0,001	+
PE	6,08	0,05>p>0,01	(+)	9,29	0,01>p>0,001	+
bE	15,37	<0,001	++	22,54	<0,001	++
pE	10,53	0,01>p>0,001	+	1,19	>0,05	Ø
oE	4,03	0,05>p>0,01	(-)	9,63	0,01>p>0,001	-
rE	0,13	>0,05	Ø	16,84	<0,001	++
Σ+	14,97	<0,001	++	8,86	0,01>p>0,001	+
MB	0,01	>0,05	Ø	4,12	0,05>p>0,01	(+)
eG	17,56	<0,001	++	25,63	<0,001	++
Pro	13,10	<0,001	++	10,73	0,01>p>0,001	-
My	18,93	<0,001	--	15,33	<0,001	--
eMy						
Promo	0,08	>0,05	Ø			
MM	0,62	>0,05	Ø	20,16	<0,001	--
Stb	50,31	<0,001	--	36,90	<0,001	--
Seg	8,92	0,01>p>0,001	-	121,2	<0,001	--
eSeg						
bSeg						
Mono	7,73	0,01>p>0,001	+			
Σ+ Prolif.	4,32	0,05>p>0,01	(+)	20,13	<0,001	--
Σ+	14,75	<0,001	--	197,8	<0,001	--

Tab.11: Signifikanzberechnung einzelner Zellgruppen unter CML-Serumzugabe - Versuch 6

4.3 Zusammenfassung der Kulturergebnisse (Versuche 1 - 6)

Erythropoese:

PRCA - Serumzusatz bewirkt in allen geprüften KM - Kulturen eine innerhalb 24 h auftretende Stimulation der Erythropoese. Dieses wird deutlich durch eine in allen PRCA-Serumzusatzkulturen auftretende signifikante Vermehrung der frühen unreifen Zellformen. Die Stärke der Stimulation, erkennbar an dem relativen Zuwachs der PE, ist in allen Versuchen etwa gleich. Eine Ausnahme bildet möglicherweise die KM - Kultur von Versuch 6 (Fetus 8 - 24.SSW), die eine sehr starke Stimulation nach 48 h zeigte. Die mittleren rMI aller PRCA-Serumzusatzkulturen sind im Vergleich zu denen der Kontrollkulturen bei 24 und 48 h eindeutig signifikant, und bei 72 h nicht signifikant,erhöht (Tab.12).

CML - Serumzusatz bewirkt in allen geprüften KM - Kulturen erst ab 48 h eine Stimulation der Erythropoese. Bei 24 h ist dieser stimulierende Effekt noch nicht sichtbar. Die Stimulation zeigt sich auch hier in einer meistens statistisch signifikanten Vermehrung der frühen Zellformen bei 48 h und einem Anstieg der rMI. Die mittleren rMI aller CML - Serumzusatzkulturen sind gegenüber denen der Kontrollkulturen ebenfalls erst ab 48 h signifikant erhöht (Tab.13).

Granulopoese:

PRCA - Serumzusatz bewirkt in allen geprüften KM - Kulturen eine Stimulation der Granulopoese, die allerdings in allen Fällen erst ab 48 h deutlich sichtbar wird. Dieses ist nachweisbar aus einer Vermehrung der frühen Zellformen ab 48 h und einem Anstieg der wMI im Vergleich zu den Kontrollkulturen in fast allen Versuchen. Die mittleren wMI aller PRCA-Serumzusatzkulturen sind ebenfalls erst bei 48 und 72 h gegenüber denen der Kontrollkulturen statistisch signifikant erhöht (Tab.12).

CML - Serumzusatz bewirkt in allen geprüften KM - Kulturen eine innerhalb 24 h auftretende Stimulation der Granulopoese. Dieses wird sichtbar durch eine in allen Fällen auftretende

Vermehrung der frühen Zellformen und einem Anstieg der wMI schon bei 24 h. Die mittleren Mitoseindices aller CML - Serumzusatzkulturen sind sowohl bei 24 h, als auch bei 48 h gegen die der Kontrollkulturen signifikant erhöht (Tab.13).

Mittlere MI der eG (Tab.14, Tab.15):

Ausgewertet wurden die MI der eG-Mitosen aller PRCA-, CML-Serumzusatz- und Kontrollkulturen. Die eG-Mitosen konnten auf Grund der charakteristischen Zytoplasmafarbe (Kapitel 3.3) eindeutig von Pro-Mitosen unterschieden werden. Bis auf Fetus 1 (16.SSW) enthielten alle Originale eG-Mitosen. Die mittleren Mitoseindices der eG (Tab.14, Tab.15) sind bei 24 h sowohl in den Kontroll-, als auch in den PRCA- und CML-Serumzusatzkulturen im Vergleich zu den zugehörigen Originalen deutlich erniedrigt. Nach 48 h finden sich eG-Mitosen nur in den PRCA- und CML-Serumzusatzkulturen, jedoch nicht mehr in den Kontrollkulturen.

G/E-Indices:

Auf eine Darstellung der G/E-Indices wurde wegen mangelnder charakteristischer Veränderungen verzichtet.

Karyologische Kurven (Abb.26, Abb.27):

Berechnet wurde die prozentuale Mitosephasenverteilung der gezählten Mitosen aller Kulturtage für Kontroll-, PRCA- und CML-Serumzusatzkulturen, sowie für Erythroblasten und Granuloblasten. Die Ergebnisse wurden als karyologische Kurven dargestellt (Abb.26).

Die karyologischen Kurven (Abb.26) stimmen weitgehend mit denen von BOLL und MERSCH (6,7) für Kulturen mit humanem adultem KM überein. Sowohl in den PRCA-, als auch in den CML-Serumzusatzkulturen sind, im Vergleich zu den Kontrollkulturen, bei den Erythroblastenmitosen die Prophasen und frühen Metaphasen vermehrt und die späten Metaphasen vermindert.

Außerdem wurde die prozentuale Mitosephasenverteilung der gezählten eG-Mitosen aller Originale und aller Kulturen zu allen Kulturzeiten berechnet und als karyologische Kurve dargestellt (Abb.27). Die meisten eG-Mitosen befinden sich

in der späten Metaphase (40,4%), der frühen Metaphase (31,6%) und der Prophase (17,5%). Die eG-Mitosen sind nur vereinzelt in der Ana- und der Rekonstruktionsphase und garnicht in der Telophase zu finden.

Sonstige Zellen:

Die weder der Erythropoese, noch der Granulopoese zugehörigen Zellen ließen sich in allen Versuchen sehr schlecht kultivieren und erlauben deshalb keine eindeutige Aussage. Eine Ausnahme bildeten lediglich die phagozytierenden Retikulumzellen. Sie vermehrten, bzw. verminderten sich in den einzelnen Versuchen unterschiedlich. Aus den Veränderungen ihrer Zellzahlen läßt sich allerdings kein einheitlicher Trend feststellen. Auf eine nähere Beschreibung wurde deshalb verzichtet.

ERYTHROPOESE

Std	K/Z	Mitosen	tgf.Z.	MI (‰)	x^2	p	Sign.	n
0		65	2074	31,3				5
24	K	39	2671	14,6	25,80	<0,001	++	5
	Z	132	3734	35,4				
48	K	14	1434	9,8	26,98	<0,001	++	2
	Z	54	1341	40,3				
72	K	1	685	1,5	3,00	>0,05	ø	2
	Z	7	918	7,6				

GRANULOPOESE

Std	K/Z	Mitosen	tgf.Z.	wMI (‰)	x^2	p	Sign.	n
0		61	2452	24,9				5
24	K	49	2861	17,1	0,01	>0,05	ø	5
	Z	41	2363	17,4				
48	K	13	837	15,5	5,52	0,05>p>0,01	(+)	2
	Z	28	843	33,2				
72	K	1	486	2,1	7,66	0,01>p>0,001	+	2
	Z	17	835	20,3				

Tab.12: Mittlere Mitoseindices aller Kontroll- (K) und PRCA-Serumzusatzkulturen (Z) mit Signifikanzberechnung (n = Anzahl der ausgewerteten Versuche)

ERYTHROPOESE

Std	K/Z	Mitosen	tgf.Z.	rMI (‰)	x^2	p	Sign.	n
0		32	1308	24,5				3
24	K	12	1872	6,4	2,82	>0,05	ø	3
	Z	18	1520	11,8				
48	K	2	546	3,7	8,61	0,01>p>0,001	+	1
	Z	15	615	24,4				

GRANULOPOESE

Std	K/Z	Mitosen	tgf.Z.	wMI (‰)	x^2	p	Sign	n
0		25	1752	14,3				3
24	K	16	1802	8,8	5,09	0,05>p>0,01	(+)	3
	Z	36	2093	17,2				
48	K	9	492	18,3	4,06	0,05>p>0,01	(+)	1
	Z	15	363	41,3				

Tab.13: Mittlere Mitoseindices aller Kontroll- (K) und CML-Serumzusatzkulturen (Z) mit Signifikanzberechnung (n = Anzahl der ausgewerteten Versuche)

Std	K/Z	Mitosen	tgf.Z.	MI(‰)	n
0		15	764	19,6	5
24	K	10	664	15,1	5
	Z	6	525	11,4	
48	K	0	59	0	2
	Z	4	327	12,2	
72	K	0	19	0	2
	Z	3	299	10,0	

Tab.14: Mittlere Mitoseindices der embryonalen Granuloblasten aller Kontroll- (K) und PRCA-Serumzusatzkulturen (Z) (n = Anzahl der ausgewerteten Versuche)

Std	K/Z	Mitosen	tgf.Z.	MI(‰)	n
0		10	616	16,2	3
24	K	4	453	8,8	3
	Z	5	746	6,7	
48	K	0	30	0	1
	Z	5	330	15,1	

Tab.15: Mittlere Mitoseindices der embryonalen Granuloblasten aller Kontroll- (K) und CML-Serumzusatzkulturen (Z) (n = Anzahl der ausgewerteten Versuche)

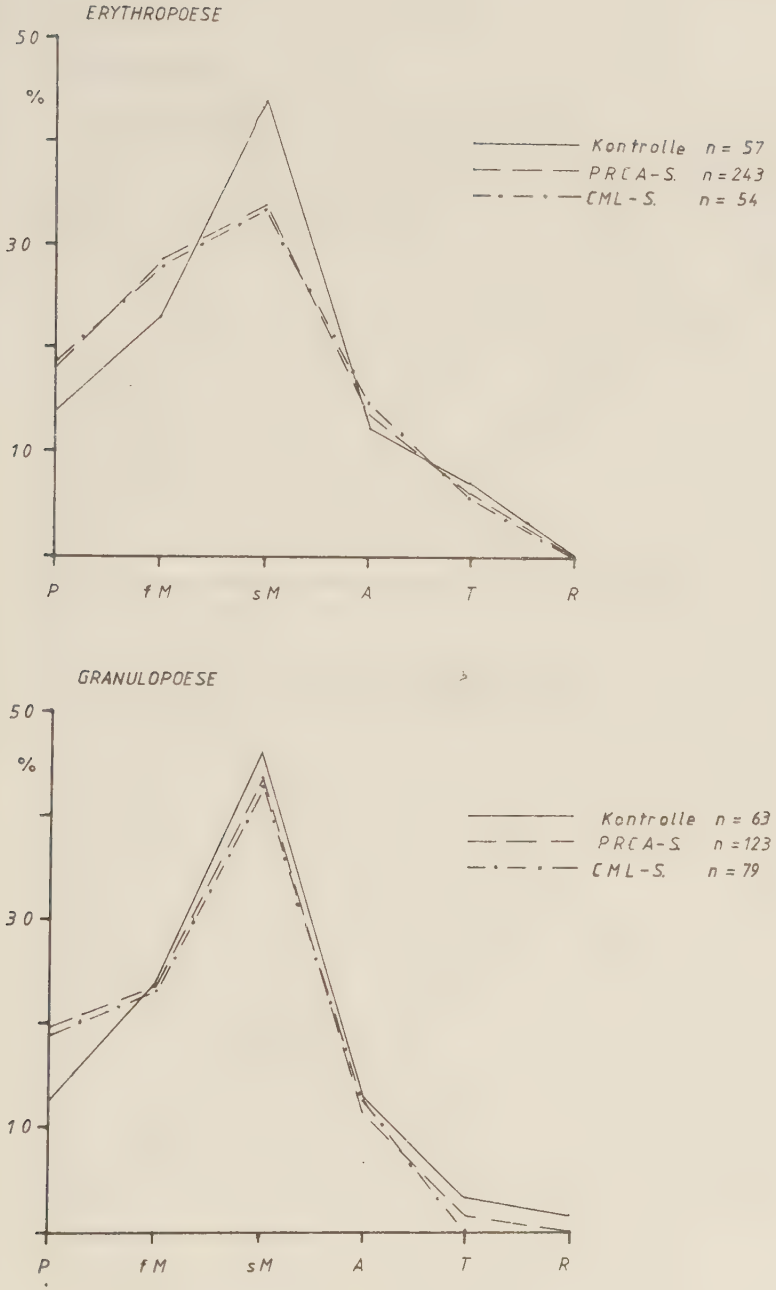


Abb.26: Karyologische Kurven der gezählten Mitosen (n) zu allen Kulturzeiten (Versuche 1-6)

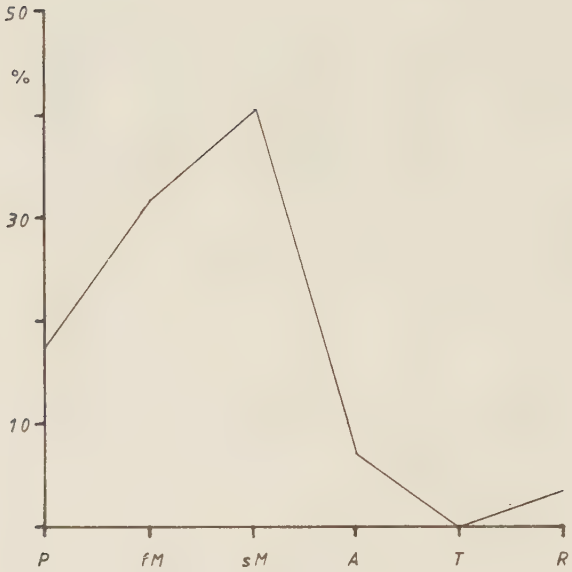


Abb.27: Karyologische Kurve aller gezählten eG-Mitosen
(22 Mitosen in allen Originalen, 35 Mitosen in vitro)

5. DISKUSSION

Im ersten Teil der Arbeit kann auf Grund lichtmikroskopischer Differentialzählungen von Knochenmarkausstrichen humaner Feten eine Aussage über deren Knochenmarkzusammensetzung zwischen der 16. und 24. SSW gemacht werden. Aus jeder SSW zwischen der 16. und 24. SSW, mit Ausnahme der 22. SSW, wurde ein KM - Ausstrich ausgewertet.

In der Literatur existiert nur eine sehr begrenzte Anzahl von morphologischen Untersuchungen über die Differentialverteilung der Zellelemente humanen fetalen Knochenmarks zwischen der 16. und 24. SSW. Die Ergebnisse dieser Arbeiten weichen oft erheblich voneinander ab, was auf die nicht einheitlich geregelte Definition von fetalen Knochenmarkzellen zurückzuführen ist. Dieses macht einen Vergleich der in der Literatur existierenden Untersuchungen oft unmöglich, wie aus den Übersichten von BOLL (9) und HAAS (30) zu ersehen ist. Die in dieser Arbeit benutzten Zelldefinitionen sind, in Anlehnung an den Atlas von KELEMEN, CALVO und FLIEDNER (35), in Kapitel 3.3 ausführlich wiedergegeben.

In der vorliegenden Untersuchung kann eine weitgehende Übereinstimmung der Ergebnisse über die quantitative Zusammensetzung von humanem fetalem Knochenmark zwischen der 16. und 24. SSW mit den Untersuchungen von YOFFEY und THOMAS (58) und KELEMEN, CALVO und FLIEDNER (35) erzielt werden.

Bemerkenswert ist der sehr hohe Anteil von kl. Lymphozyten (zwischen 10 und 38%) in unserem Untersuchungsgut. Dieses entspricht weitgehend den von KELEMEN, CALVO und FLIEDNER (35) und YOFFEY und THOMAS (58) gefundenen Werten bei Feten des gleichen Untersuchungsalters. Eine eindeutige Erklärung der großen Schwankungsbreite in der Anzahl der kleinen Lymphozyten in unserer Arbeit konnte nicht gefunden werden. Möglicherweise spielen die unterschiedlichen anamnestischen Daten der untersuchten Feten eine Rolle. Der Anteil der Lymphozyten im menschlichen Knochenmark beträgt zur Zeit der Geburt etwa 15%, wie ROSSE et al. (48) an einem umfangreichen Patientengut zeigten.

Die Differentialverteilung der Erythropoese (Abb.2) bleibt während des gesamten Untersuchungszeitraums einigermaßen konstant. Der Anstieg der G/E-Indices zwischen der 18. und 21. SSW (Abb.5) ist daher mit einiger Sicherheit durch eine Vermehrung der granulopoetischen Zellen und nicht durch eine Abnahme der Erythroblasten bedingt. Diese Annahme wird unterstützt durch den tendenziellen Anstieg der wMI zwischen der 17. und 21. SSW. Ferner läßt die Differentialverteilung aller Knochenmarkzellen (Abb.1) und der granulopoetischen Zellen (Abb.3) eine Zunahme der reifen granulopoetischen Zellen (Stb. und Seg.) ab der 20. SSW (mit Ausnahme der 21.SSW) im Vergleich zum vorhergehenden Zeitraum erkennen.

Zusammengefaßt kann somit von einer unreifen und stark proliferierenden Phase der Granulopoese von der 16. bis etwa zur 21. SSW gesprochen werden, die von einer durch Ausreifung und geringerer Proliferation geprägten Phase gefolgt wird. Diese Beobachtung wird bestätigt durch die Untersuchungen von PLAYFAIR et al. (45), die die Konzentration von Zellen im peripheren Blut von humanen Feten zwischen der 8. und 27. SSW bestimmten. Die Konzentration der Erythroblasten im Blut zeigte während dieses Untersuchungszeitraums mit steigendem Gestationsalter eine leicht abfallende Tendenz. Im Gegensatz dazu stellten sie einen Anstieg der granulopoetischen Zellen im Blut bis etwa zur 22. SSW fest, der nach diesem Zeitraum stagnierte. Da das Knochenmark im Feten ab der 13. SSW das blutbildende Organ ist, welches eindeutig den größten Anteil der granulopoetischen Zellen erzeugt, sind die Ergebnisse im Blut dazu geeignet, mit denen der hier vorgelegten Arbeit verglichen zu werden.

Wie aus Tab.1 ersichtlich ist, wurden im KM von 6 untersuchten Feten Plasmazellen beobachtet. Es wurden nur die Zellen als Plasmazellen gewertet, die eindeutig die "Definition nach Marschalko" (S. auch Kapitel 3.3) erfüllten. Dieses widerspricht zweifellos der in der Einleitung zitierten Untersuchung von BRIDGES et al. (13), die keine Plasmazellen im menschlichen KM vor dem ersten postnatalen Lebensmonat sahen. Der Nachweis von Plasmazellen in Lymphknoten von Feten nach

intrauteriner Infektion mit Röteln gelang jedoch SINGER et al. (52). Bei zwei Feten unseres Beobachtungsgutes, bei denen eine Rötelninfektion gesichert worden war (Fetus 2 - 17.SSW und Fetus 5 - 20.SSW), konnten Plasmazellen im KM nachgewiesen werden (Tab.1). Die Anwesenheit von Plasmazellen im Thymus gesunder menschlicher Feten ab der 20.SSW demonstrierten TAYLOR und SKINNER (53) mit immunohistochemischen Methoden. In unserer Arbeit wurden bei 2 Feten, bei denen mit großer Wahrscheinlichkeit eine intrauterine Infektion ausgeschlossen werden kann (Fetus 1 - 16. SSW und Fetus 8 - 24. SSW), Plasmazellen im Knochenmark entdeckt (Tab.1). Diese Ergebnisse, zusammen mit denen der in der Einleitung erwähnten Untersuchungen von van FURTH et al. (26) und SILVERSTEIN und LUKES (50) sprechen für die Existenz eines kompetenten Immunsystems während der Fetalzeit im Menschen. Ob es im fetalen Knochenmark physiologischerweise zur Bildung von Plasmazellen kommt, weil den Feten normalerweise im Schutz der Mutter keine Antigene erreichen, bleibt unklar.

Das Verhalten der embryonalen Granuloblasten (eG) in der Fetalperiode wird, zusammen mit der Diskussion über das Verhalten der eG in den Kulturen, weiter unten abgehandelt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde Knochenmark von 5 Feten (18.SSW-20.SSW-21SSW-23.SSW-24.SSW) mit der Suspensionskulturmethode mit und ohne Zugabe von PRCA - Serum kultiviert. Ebenso wurden Knochenmarkkulturen von 3 Feten (19.SSW-21.SSW-24.SSW) mit und ohne Zugabe von CML-Serum angelegt.

Das Serum einer Patientin mit chronischer Erythroblastopenie (PRCA) wurde ausgewählt, weil Seren dieser Patienten nachgewiesenermaßen stets hohe Ep - Spiegel besitzen (46). Somit sollte auf Grund von "in vitro Versuchen" die Ansprechbarkeit fetaler Knochenmarkzellen zwischen der 18. und 24.SSW auf Erythropoetin untersucht werden.

Die Ansprechbarkeit fetaler Dottersack- und Leberzellen auf Erythropoetin im "in vitro Versuch" untersuchten COLE und PAUL (15) an fetalen Mäusen. Sie legten Suspensionskulturen von Dottersack- und Leberzellen fetaler Mäuse verschiedenen Alters nach Zugabe von Erythropoetin an. Den Ep - Effekt

registrierten sie anhand der Syntheserate von Hämoglobin. Die Ergebnisse zeigten eine fehlende Ep - Sensibilität von Dottersackzellen und eine dreiphasige Ep - Sensibilität von fetalen Leberzellen. In der frühen Fetalperiode reagierten die fetalen Leberzellen auf Ep nicht, während sie in der mittleren Fetalperiode stark und am Ende der Schwangerschaft nicht mehr auf Ep ansprachen. Ähnliche Ergebnisse erbrachten Untersuchungen von COLE, HUNTER und PAUL an Ratten (16) und von ZANJANI et al. an Schafen (65).Letztgenannte Autorengruppe untersuchte zusätzlich die Ep - Sensibilität von fetaler Milz- und Knochenmarkerythropoese von Schafen. Sowohl Milz-, als auch Knochenmarkerythropoese waren während des gesamten Untersuchungszeitraums, dem letzten Schwangerschaftsdrittel, Ep - sensibel. Die Ansprechbarkeit menschlicher fetaler Leber- und Milzerythropoese auf Erythropoetin untersuchte BASCH (3) im "in vitro Versuch". Das methodische Vorgehen war der oben zitierten Arbeit von COLE und PAUL (15) sehr ähnlich. Fetale Lebererythropoese zeigte ein maximales Ansprechen auf Erythropoetin zwischen der 14. und 20. SSW. Sowohl vor, als auch nach dieser Fetalperiode fehlte ein Ansprechen menschlicher fetaler Leberzellen auf Erythropoetin. Ein Effekt von Ep auf fetale Milzerythropoese war ab der 15. SSW, jedoch mit maximaler Ausprägung ab der 19.SSW nachzuweisen. Eine stärkere Sensibilität der CFU_e in fetaler Mäuseleber als in adultem Mäuseknochenmark auf Erythropoetin fanden RICH und KUBANEK (47). Eine stärkere Reaktion der menschlichen fetalen Lebererythropoese auf Ep, als dieses bei menschlichem adultem Knochenmark der Fall war, stellte BASCH (3) in der oben zitierten Untersuchung fest. Proliferationskinetische Untersuchungen führten TERADA et al. (54) mit Kulturen fetaler Mäuseleberzellen unter Ep - Zugabe durch. Erythropoetin bewirkte eine Vermehrung der frühen erythropoetischen Zellformen (PE, bE und pE) in den Ep - Zusatzkulturen im Vergleich zu den Ep freien Kontrollkulturen. Mit immunozytochemischen Methoden wurden Ep - Receptoren an Proerythroblasten, basophilen und polychromatischen Erythroblasten in fetaler Mäuseleber von LAFFERTY et al. (37) nachgewiesen.

In der hier vorliegenden Untersuchung konnte in allen PRCA-Serumzusatzkulturen, im Vergleich zu den Kontrollkulturen, eine signifikante Stimulation der Erythropoese innerhalb von 24 h und der Granulopoese ab 48 h, ersichtlich an der Vermehrung der unreifen Zellen beider Zellreihen und der Erhöhung der Mitoseindices, nachgewiesen werden. Die Stimulation der Erythropoese kann möglicherweise als Erythropoetin-Effekt gewertet werden. Auch die Granulopoese wurde stimuliert. Hierzu gibt es keine Literatur, aber in bisher unveröffentlichten Versuchen konnte mit dem Serum der gleichen PRCA - Patientin in Kulturen normalen adulten Knochenmarkes mit dem gleichen kulturellen Verfahren eine Erythroblastenstimulation und eine Stimulation der Granulopoese von BOLL (12) erzeugt werden.

Die in dieser Untersuchung festgestellte Ep - Sensibilität humaner fetaler Knochenmarkzellen zwischen der 18. und 24. SSW lassen, zusammen mit den Ergebnissen der oben zitierten Arbeiten über die Ep - Sensibilität verschiedener fetaler Organe und den in der Einleitung zitierten Arbeiten über die autonome Erythropoetin-Produktion von Feten, darauf schließen, daß Ep im menschlichen Feten an der Regulation der Erythropoese beteiligt ist.

Die Seren von Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie (CML) wurden ausgewählt, weil Seren dieser Patienten nachgewiesenermaßen stets einen hohen Spiegel von CSA (Colony stimulating activity) besitzen (18,41). Somit sollte auf Grund von "in vitro Versuchen" die Ansprechbarkeit humaner fetaler Knochenmarkzellen zwischen der 19. und 24. SSW auf CSA untersucht werden. Die CML-Seren wurden vor den Versuchen auf -20°C gefroren, um somit vorhandene Granulozytenchalone zu eliminieren (10).

Mit einem ähnlichen kulturellen Verfahren konnte die Stimulation der Granulopoese, erkennbar an einer verstärkten Proliferation der Granuloblasten, durch vorher tiefgefrorenes CML - Serum in Kulturen normaler adulter Knochenmarkzellen von BOLL (10) nachgewiesen werden. In der hier vorliegenden Arbeit wurde in allen fetalen CML-Serumzusatzkulturen eine signifikante Stimulation der Granulopoese ab 24 h und der

Erythropoese ab 48 h im Vergleich zu den serumfreien Kontrollkulturen festgestellt. Dieses wird ersichtlich aus den erhöhten Mitoseindices und der Vermehrung beider Zellreihen in den CML - Serumzusatzkulturen. Der Grund der Stimulation der Erythropoese durch CML - Serum ist unbekannt und wurde in adultem KM bisher nicht nachgewiesen (18).

Von besonderem Interesse ist das Proliferationsverhalten der embryonalen Granuloblasten (eG), die erstmals von KELEMEN, CALVO und FLIEDNER (35) beschrieben wurden. Sie ordneten diese Zelle auf Grund morphologischer Charakteristika zwischen Myeloblasten und Promyelozyten in die granulopoetische Reihe ein. In der hier durchgeführten Untersuchung konnte diese Ansicht durch die proliferationskinetischen Vorgänge in den Kulturen bestätigt werden. Es wird besonders deutlich in den Graphiken über den relativen Zuwachs einzelner Zellgruppen unter Serumzusatz von Versuch 1 (Abb.9), Versuch 3 (Abb.15) und Versuch 6 (Abb.24 und Abb.25). Die embryonalen Granuloblasten erfahren den stärksten Zuwachs nämlich erst nach einem schon vorausgegangenen Anstieg der Myeloblastenzahl und stets vor einer stärkeren Vermehrung der Promyelozyten. Auch in vivo zeichnet sich der eG durch einen hohen Mitoseindex aus. In der Fetalzeit bis zur 21. SSW liegt der Anteil der eG an der Gesamtzellzahl des humanen Knochenmarkes meist deutlich höher als nach diesem Zeitpunkt. Da jedoch der Zeitraum von der 16. bis zur 21.SSW durch eine unreife und stark proliferierende Phase der Granulopoese gekennzeichnet ist, wie wir weiter oben darlegten, lassen auch diese Beobachtungen die Zuordnungen des embryonalen Granuloblasten zu den unreifen granulopoetischen Zellen vermuten.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Unter Anwendung lichtmikroskopischer Differentialzählungen von Knochenmark humaner Feten zwischen der 16. und 24. Gestationswoche konnte die Zusammensetzung und Entwicklung der Knochenmark-Hämatopoese während dieses Zeitraums untersucht werden.

Herausragend war die Beobachtung, daß die fetale Granulopoese etwa bis zur 21. SSW durch eine unreife, stark proliferierende Phase gekennzeichnet ist, die ab diesem Zeitpunkt von einer Phase der Ausreifung und geringeren Proliferation abgelöst wird. Die Differentialverteilung der Erythropoese zeigte in obigem Untersuchungszeitraum keine signifikanten Veränderungen.

Ferner wurden einige Plasmazellen im Knochenmark von 6 Feten zwischen der 16. und 24. SSW beobachtet. Dieses Vorhandensein von Marschalko-Plasmazellen im KM von Feten wurde mit einem schon zu dieser frühen Fetalperiode vorhandenen kompetenten Immunsystem im Menschen begründet.

Weiterhin wurde die Wirkung von Patientenseren bei chronischer Erythroblastopenie (PRCA) und chronisch myeloischer Leukämie (CML) auf humanes fetales Knochenmark zwischen der 18. und 24. SSW in vitro untersucht.

PRCA - Serumzusatz als humanes Erythropoetin bewirkte in den Kulturen eine signifikante Stimulation der Erythropoese innerhalb von 24 h und der Granulopoese ab 48 h. Die Wirkung des PRCA - Serumzusatzes wurde auf adulte wie fetale Erythropoese nachgewiesen. Daraus wurde geschlossen, daß humane fetale Knochenmarkhämatopoese zwischen der 18. und 24. SSW Erythropoetin-sensibel ist.

CML - Serumzusatz, bekannt als Stimulans adulter Granulopoese wie CFU_c, bewirkte in den Kulturen eine signifikante Stimulation der fetalen Granulopoese ab 24 h und der Erythropoese ab 48 h.

Weiterhin wurde der embryonale Granuloblast, eine ausschließlich im menschlichen fetalen Knochenmark vorkommende und zuerst von KELEMEN, FLIEDNER und CALVO beschriebene Zelle, auf Grund von proliferationskinetischen Beobachtungen zwischen Myeloblasten und Promyelozyten in die granulopoetische Reihe eingeordnet.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Andersen, V., E. Andersen : Changes in blood lymphocytes during the neonatal period. Acta Paediat. Scand. 63, 266 (1974)

2. Barnes, D.W.H., C.E. Ford, J.F. Loutit : Haemopoietic stem cells. The Lancet 1 : 1395 (1964)

3. Basch, R.S. : Hemoglobin synthesis in short-term cultures of human fetal hemopoietic tissues. Blood 39, 531 (1972)

4. Begemann, H., J. Rastetter : Atlas der klinischen Hämatologie. 2. Auflage, Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York (1972)

5. Belitz, H.J. : Die Anwendung statistischer Methoden in der Biologie. Sonderdruck aus: Der Mathematikunterricht. Heft 3/60. Ernst Klett Verlag, Stuttgart (1960)

6. Boll, I., G. Mersch : Morphologische Untersuchungen zur Proliferationskinetik der normalen u. pathologischen Erythropoese in vitro. Blut 17, 193 (1968)

7. Boll, I., G. Mersch : Morphologische Untersuchungen zur Proliferationskinetik der normalen und pathologischen Granulopoese in vitro. Blut 19, 257 (1969)

8. Boll, I., H. Collmann, Ch. Aust : Qunatitative Bestimmung der Proliferationskinetik des menschlichen Knochenmarkes während drei Kulturtagen. Blut 31, 201 (1975)

9. Boll, I.: Granulocytopoese - Morphologie, Kinetik und Funktion. Handbuch der Inneren Medizin II, 3, 193 (Hrsg.: H. Begemann), Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1976)

10. Boll, I., and coworkers : Serum factors influencing human granulocytopoietic proliferation in clot cultures. Exp. Hemat. 7, 121 (1979)

11. Boll, I. : Zytologische Knochenmarkdiagnostik. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1980)

12. Boll, I. : Mündliche Mitteilungen (1983)

13. Bridges, B.A., R.H.Condie, S.J.Zak, R.A.Good : The morphologic basis of antibody formation development during the neonatal period. J. Lab. & Clin. Med. 53, 331 (1959)

14. Bridges, J.B., J.M.Bridges, G.J.A. Lyons, A.R. and M.G. Nelson. Toxic marrow failure treated by a homograft of foetal hemopoietic tissue. The Lancet 1 : 629 (1960)

15. Cole, R.J., J. Paul : The effect of erythropoietin on haem synthesis in the mouse yolk sac and cultured foetal liver cells. J. Embryol. Exp. Morph. 15, 245 (1966)

16. Cole, R.J., J. Hunter, J. Paul : Hormonal regulation of pre-natal haemoglobin synthesis by erythropoietin. Brit. J. Haemat. 14, 477 (1968)

17. DeGowin, R.L., D.B. Gibson : Pluripotential stem cell differentiation in hemopoietic colonies. Blood 47, 315 (1976)

18. Drings, P. : Die chronische myeloische Leukämie.
In : W. Queißer (Hrsg.): Das Knochenmark.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1978)

19. Emery, J.L., F. Follet : Regression of bone marrow haemopoiesis from the terminal digits in the foetus and infant.
Brit. J. Haemat. 10,485 (1964)

20. Finne, P.H. : Erythropoietin levels in the amniotic fluid, particularly in Rh - immunized pregnancies. Acta Paediat. Scand. 53, 269 (1964)

21. Finne, P.H. : Erythropoietin levels in cord blood as an indicator of intrauterine hypoxia.
Acta Paediat. Scand. 55, 478 (1966)

22. Finne, P.H., S. Halvorsen : Regulation of erythropoiesis in the fetus and newborn.
Arch. Dis. Child. 47, 683 (1972)

23. Fukuda, T. : Fetal hemopoiesis. I. Electron microscopic studies on human yolc sac hemopoiesis.
Virchows Arch. Abt.B 14, 197 (1973)

24. Fukuda, T. : Undifferentiated mononuclear cell in human embryonic liver. Presumptive hematopoietic stem cell.
Virchows Arch. Abt.B 14, 31 (1973)

25. Fukuda, T. : Fetal hemopoiesis. II.Electron microscopic studies on human hepatic hemopoiesis.
Virchows Arch. Abt.B 16, 249 (1974)

26. Furth, R.van, H.R.E. Schuit, W. Hijmans : The immunological development of the human fetus.
J. Exp. Med. 122, 1173 (1965)

27. Furth, R.van : Origin and kinetics of monocytes and macrophages. Seminars Hemat. 7,125 (1970)

28. Gruber, D.F., J.R. Zucali, E.A. Mirand : Identification of erythropoietin producing cells in fetal mouse liver cultures. Exp. Hemat. 5, 392 (1977)

29. Haas, R.J., D. Hoelzer, E. Kurrle, B.Landenberger, U. Winkler : Experimental analysis of developing hemopoiesis in fetal bone marrow. Pediat. Res. 10, 164 (1976)

30. Haas, R.J. : Die Entwicklung der Knochenmarkhämopoese. In : W. Queißer (Hrsg.): Das Knochenmark. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1978)

31. Halvorsen K., P. Haga, S. Halvorsen : Regulation of erythropoiesis in the foetus and neonate. In : K. Nakao (Hrsg.): Erythropoiesis. University Park Press, Baltimore (1974)

32. Hammar, J.A.: Primäres und rotes Knochenmark. Anat. Anz. 19, 567 (1901)

33. Heckner, F. : Praktikum der mikroskopischen Hämatologie. 5. Auflage, Urban & Schwarzenberg Verlag, München-Wien-Baltimore (1981)

34. Hoyes, A.D. : The human foetal yole sac. An ultrastructural study of four specimens. Z. Zellforsch. 99, 469 (1969)

35. Kelemen, E., W. Calvo, T.M. Fliedner : Atlas of human hemopoietic development. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1979)

36. Knutzon, S. : In vitro growth of granulocytic colonies from circulating cells in human cord blood. Blood 43, 357 (1974)

37. Lafferty, M.D., G.A. Ackerman, C.D.R. Dunn, R.D. Lange : The ultrastructural, immunocytochemical demonstration of erythropoietin receptors on developing erythrocytic cells of fetal mouse liver. Exp. Hematol. 8, 1063 (1980)

38. Lucarelli, G., A. Porcellini, C. Carnevali, A. Carmena, F. Stohlman : Fetal and neonatal erythropoiesis. Ann. NY. Acad. Sci. 149, 544 (1968)

39. Maximow, A. : Bindegewebe und blutbildende Gewebe. In : W. von Mollendorff (Hrsg.): Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen. Julius Springer Verlag, Berlin, Band 2 (1927)

40. Meberg, A. : Plasma erythropoietin levels in fetal and newborn rats : Response to hypoxia. Exp. Hematol. 8, 615 (1980)

41. Metcalf, D., M.A.S. Moore : Haemopoietic cells. North Holland Publishing Comp., Amsterdam-London (1971)

42. Meuret, G. : Das monozytäre Zellsystem. In : W. Queißer (Hrsg.): Das Knochenmark. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1978)

43. Moore, M.A.S., J.T.T. Owen : Stem - cell migration in developing myeloid and lymphoid systems. The Lancet 2 : 658 (1967)

44. Moore, M.A.S., D. Metcalf : Ontogeny of the haemopoietic system : Yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. Brit. J. Haemat. 18, 279 (1970)

45. Playfair, J.H.L., M.R. Wolfendale, H.E.M. Kay : The leucocytes of peripheral blood in the human fetus. Brit. J. Haemat. 9,336 (1963)

46. Queißer, W. : Die Erythroblastopenien. In: W. Queißer (Hrsg.): Das Knochenmark. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1978)

47. Rich, I.N., B. Kubanek : Erythroid colony formation (CFU_e) in fetal liver and adult bone marrow and spleen from the mouse. Blut 33,171 (1976)

48. Rosse, C., M.J. Kraemer, T.L.Dillon, R.McFarland, N.J. Smith : Bone marrow cell population of normal infants: The predominance of lymphocytes. J. Lab. & Clin. Med. 89, 1225 (1977)

49. Schooley, J.C., J.F. Garcia, L.N. Cantor, W.V. Havens : A summary of some studies on erythropoiesis using anti-erythropoietin immune serum. Ann. NY. Acad. Sci. 149, 266 (1968)

50. Silverstein, A.M., R.J. Lukes : Fetal response to antigenic stimulus. I.Plasma cellular and lymphoid reactions in the human fetus to intrauterine infection. Lab. Invest. 11, 918 (1962)

51. Silverstein, A.M. : Congenital syphilis and the immunogenesis in the human foetus. Nature 194, 196 (1962)

52. Singer, D.B., A.J. Rudolph, H.S. Rosenberg, W.E. Rawls, M. Bowink : Pathology of the congenital rubella syndrome. J.Pediatr. 71, 665 (1967)

53. Taylor, C.R., J.M.Skinner : Evidence for significant hematopoiesis in the human thymus. Blood 47, 305 (1976)

54. Terada, M., F. Ramirez, L. Cantor, G.M. Maniatis, A. Bank, R.A. Rifkind, P.A.Marks : Mechanism of action of erythropoietin on fetal mouse liver erythroid cell precursors. In : K. Nakao (Hrsg.): Erythropoiesis. University Park Press, Baltimore (1974)

55. Thomas, D.B., J.M. Yoffey : Human fetal hematopoiesis. II. Hepatic hematopoiesis in the human foetus. Brit. J. Haemat. 10, 193 (1964)

56. Toepfer, J.R., J.H. Morrison : Survival of lethally x - radiated rats after treatment with isogenic marrow lymphocytes. Am. J. Physiol. 223, 923 (1969)

57. Undritz, E. : Haematologische Tafeln. Sandoz AG, Nürnberg, 2. Auflage (1972)

58. Yoffey, J.M., D.B. Thomas, P.M. Russel : Studies in foetal blood formation. II. Observations on the bone marrow. J. Anat. 94,576 (1960)

59. Yoffey, J.M., D.B. Thomas : The development of bone marrow in the human foetus. J. Anat. 95, 613 (1961)

60. Yoffey, J.M., D.B. Thomas : The development of bone marrow in the human foetus. J. Anat. 98, 463 (1964)

61. Yoffey, J.M. : The stem cell problem in the fetus. In: Y.Matoth (Hrsg.): Erythropoiesis- Regulatory mechanisms and developmental aspects. Academic Press, New York- London (1970)

62. Yoffey, J.M. : Experimental approches to the stem cell problem in postnatal life. In : Y.Matoth (Hrsg.): Erythropoiesis- Regulatory mechanisms and developmental aspects. Academic Press, New York- London (1970)

63. Zanjani, E.D., E. Horger, A.S.Gordon, L.N.Cantor, D.L. Hutchinson : Erythropoietin production in the fetal lamb. J. Lab. & Clin. Med. 74, 782 (1969)

64. Zanjani, E.D., A.S. Gordon : Erythropoietin production and utilisation in fetal goats and sheep. In: Y.Matoth (Hrsg.): Erythropoiesis- Regulatory mechanisms and developmental aspects. Academic Press, New York- London (1970)

65. Zanjani, E.D., J.P.Poster, L.I.Mann, D.C.Osborn, L.R.Wassermann : Production and role of erythropoietin in fetal erythropoiesis. In : N.Nakao (Hrsg.): Erythropoiesis. University Park Press, Baltimore (1974)

66. Zucali, J.R., T.P. McDonald, D.F. Gruber, E.A.Mirand: Erythropoietin, thrombopoietin and colony stimulating activity in fetal mouse liver culture media. Exp. Hemat. 5, 385 (1977)

67. Zucker-Franklin, D., M.F. Greaves, C.E. Grossi, A.M. Marmont : Atlas of blood cells. Edi. Ermes s.r.l., Milano (1981)

8. FOTOGRAFISCHER ANHANG

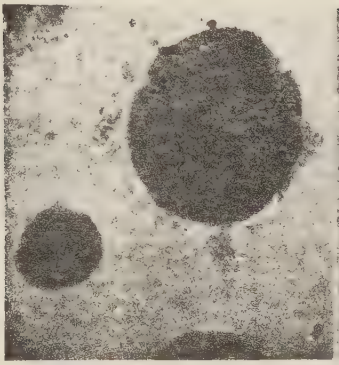
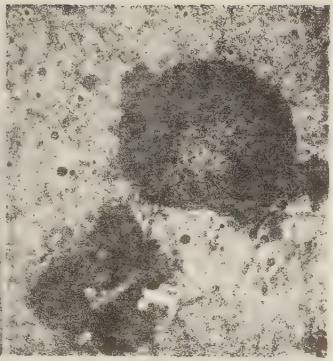
1a   1b

Foto 1: Embryonaler Granuloblast
a) und kl. Lymphozyt im KM von Fetus 6 - 21.SSW (Färbung n. Pappenheim, Ölimmersion 95fach)
b) und neutrophiler segmentkerniger Granulozyt im KM von Fetus 6 - 21.SSW (Färbung n. Pappenheim, Ölimmersion 95fach)

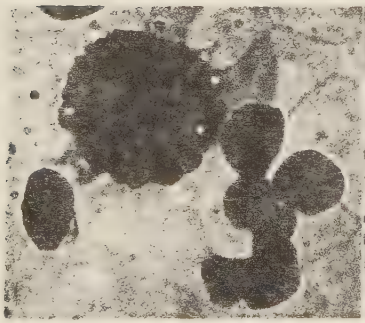
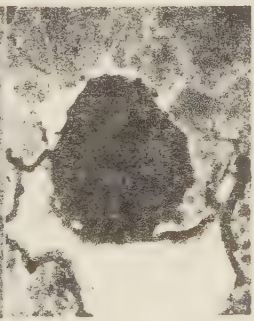
2a   2b

Foto 2: Plasmazelle
a) und kl. Lymphozyten im KM von Fetus 1 - 16.SSW (Färbung n. Pappenheim, Ölimmersion 95fach)
b) im KM von Fetus 4 - 19.SSW (Färbung n. Pappenheim, Ölimmersion 95fach)

Frau Professor Dr. med. Irene Boll danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und für die stets hilfreiche Betreuung dieser Arbeit.

Ebenso möchte ich Herrn Priv.-Doz. Dr. med. K.-M. Koeppen und Frau C. Domeyer für ihre Unterstützung danken.

LEBENSLAUF

Name: Peter Melsheimer
geboren am 27.10.1959 in Lövenich (Kr. Erkelenz)
ledig

Eltern: Ilse Melsheimer, geb. Biehl, Ärztin
Franz Melsheimer, Bergbau Dipl.-Ing.

Schule: 1966-1969 Grundschule in Oberhausen (Rheinl.)
1969-1978 Heinrich-Heine Gymnasium in Bottrop
Abitur am 12.6.1978

Studium: Human - Medizin
1978 - 1985 Freie Universität Berlin

Ärztliche Vorprüfung - August 1980
1. Abschnitt d. ärztl. Prüfung - August 1981
2. Abschnitt d. ärztl. Prüfung - März 1984
3. Abschnitt d. ärztl. Prüfung - April 1985

Approbation am 29. April 1985 in Berlin

Promoviert am 4. Oktober 1985 in Berlin

Papyrus-Druck GmbH Berlin ☎ 3416451
Dissertationen